



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

DOTTORATO INTERNAZIONALE IN SCIENZE FARMACEUTICHE

XXV CICLO

Dipartimento di Scienze del Farmaco

Vincenzina Barbera

**SINTESI DI ETEROCICLI
BIOLOGICAMENTE ATTIVI
MEDIANTE PROCESSI DOMINO**

TESI SPERIMENTALE DI DOTTORATO

COORDINATORE:
Chiar.mo Prof. G. RONSISVALLE

TUTOR:
Chiar.mo Prof. U. CHIACCHIO

TRIENNIO ACCADEMICO 2009-2012

SOMMARIO

PARTE 1: Reazioni domino intramolecolari catalizzate da complessi di palladio(II) per la sintesi di β -carboline e pirazino[1,2a]indoli diversamente funzionalizzati.

1.1 Introduzione	3
1.2 Scopo del lavoro	14
1.3 Risultati e discussione	15
1.4 Conclusioni	21
1.5 Parte sperimentale	22

PARTE 2: Sintesi ed effetti antitumorali di ossazolo[3,4-a]pirazin-6 (3H)-oni

2.1 Introduzione	34
2.2 Scopo del lavoro	52
2.3 Risultati e discussione	53
2.4 Conclusioni	82
2.5 Parte sperimentale	83

PARTE 3: Sintesi di polimeri autorigeneranti mediante reazione di Diels Alder

3.1 Introduzione	90
3.2 Scopo del lavoro	118
3.3 Risultati e discussione	119
3.4 Parte sperimentale	145

Bibliografia	150
---------------------	------------

Parte 1: Reazioni domino intramolecolari catalizzate da complessi di palladio(II) per la sintesi di β -carboline e pirazino[1,2a]indoli diversamente funzionalizzati.

1.1 Introduzione

Il palladio (Pd) è un raro e brillante metallo bianco-argenteo scoperto nel 1803 da W. H. Wollaston che lo chiamò Pallas.^[1] Il Pd, insieme col platino, rodio, rutenio, iridio e osmio forma un gruppo di elementi indicati come i metalli del gruppo del platino (MGP). Questi hanno proprietà chimiche simili, ma il palladio ha il punto di fusione più basso ed è il meno denso fra loro. Tra questi metalli di transizione ha moderatamente grandi dimensioni atomiche, maggiore del Nichel ma minore del Platino. Questo fattore sembra contribuire significativamente in alcune sue proprietà chimiche, quali la stabilità moderata dei suoi composti, la loro reattività e versatilità e selettività.

Gli Stati di ossidazione del Palladio più sono 0, +2, e +4.

La chimica del palladio e le sue applicazioni nella sintesi di composti organici ha una lunga storia, infatti già nel 1899 Sabatier mise a punto l'idrogenazione catalitica degli oli in presenza di metalli finemente polverizzati.^[2] In realtà il primo, a proporre di usare il Pd quale agente per indurre la riduzione con H₂ sembra sia stato Kolbe.^[3]

Altra diffusissima applicazione della chimica del Palladio è il processo Wacker. Esso rappresenta una delle più importanti pietre miliari nella storia dei composti di organopalladio, in quanto fornisce ormai da sessanta anni tonnellate di etilene ad acetaldeide (Figura 1.1).

L'idrogenazione catalitica e l'ossidazione Wacker hanno fortemente stabilito che il Pd e suoi composti possono servire come catalizzatori per riduzione e ossidazione. Dal 1960, la catalisi omogenea da complessi di palladio ha iniziato ad essere applicata a molecole più complesse organiche ed è diventata uno strumento

indispensabile nella sintesi chimica. Tanto che molte molecole possono essere sintetizzate in un modo molto più efficiente rispetto a prima.

Per quanto riguarda la reattività è la tendenza del Pd e dei suoi composti è sostanzialmente opposta a quella osservata con Grignard e altri reagenti organometallici "hard" e polari. [4]

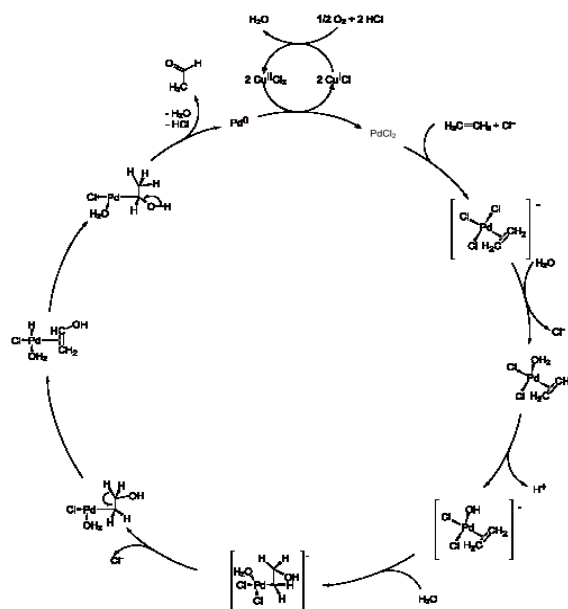
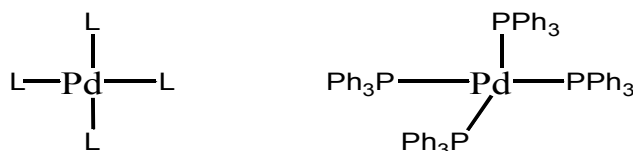


Figura 1.1

1.1.1 Reazioni fondamentali del palladio

I metalli di transizione possono avere nell'orbita più esterna fino a 18 elettroni, passano facilmente da uno stato di ossidazione ad un altro e possono essere utilizzati in quantità catalitiche. Il Palladio con 18 e- è stabile e viene indicato con Pd(0), oppure si può trovare con 14e-.



L= legante

Figura 1.2

Fin dall'inizio dello studio della catalisi mediata dal palladio, molta attenzione è stata rivolta ai complessi di Pd(0). [5] Il Pd(0) è una specie nucleofila che dà origine a diverse trasformazioni:

-
- addizione ossidativa;
 - Inserzione;
 - Transmetallazione;
 - Eliminazione riduttiva;
 - β -eliminazione.

Addizione ossidativa:

In questa reazione i due elettroni di non legame di Pd sono coinvolti nella formazione di un legame, il Pd aumenta il suo stato di ossidazione ed è promosso a Pd (II). Questo processo è simile alla formazione dei reagenti di Grignard a partire da alogenuri di alchile e Mg (0). Nella preparazione dei Grignard, il Mg (0) è ossidato a Mg (II), a formare due legami covalenti.^[6] (figura 1.3)

Secondo la regola dei 18-elettroni, un complesso Pd (0) stabile è ottenuto quando la somma degli elettroni nel livello energetico *d* del Pd e gli elettroni donati dai ligandi è pari a diciotto. I complessi che obbediscono a questa regola si dice che siano coordinativamente saturi.

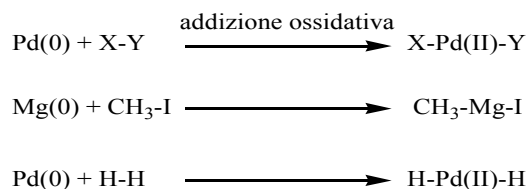
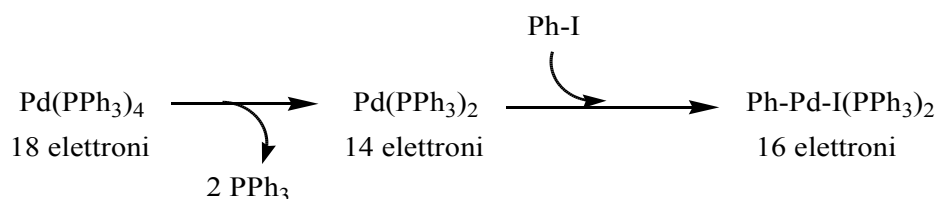


Figura 1.3

L'addizione ossidativa si verifica con complessi coordinativamente insaturi. Ad esempio il Pd(PPh₃)₄ in soluzione subisce una dissociazione reversibile in situ, per dare la specie Pd(PPh₃)₂ (complesso insaturo 14-elettroni) che è in grado di subire addizione ossidativa.^[7]

Figura 1.4



Una maggiore densità elettronica sul Pd, ottenuta mediante leganti σ -donatori, quali le trialchil fosfine, facilita il processo di ossidazione.

Un esempio importante è la reazione catalizzata da Pd su ossime, come la ammino Heck,^[8] essa determina la formazione di un legame Pd-immina mediante un processo di addizione ossidativa coinvolgendo la scissione di legami covalenti.

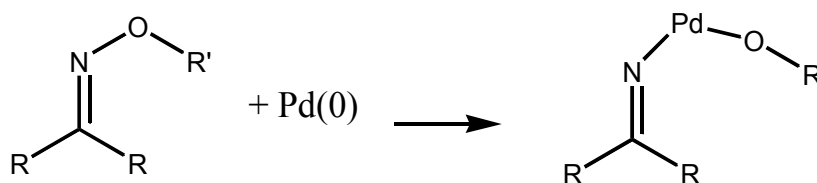


Figura 1.5

Inserzione:

L'inserzione è un processo reversibile. Ne sono noti due tipi: α,β - (o 1,2-) e α,α - (o 1,1-) inserzione. Il più diffuso è l' α,β -inserzione a legami insaturi come alcheni e alchini. Un esempio è l'idropalladiazione di un alchene, che consiste nell'inserzione di Pd-H e nella generazione di un complesso di alchil palladio. Negli alchini la reazione può essere di 'ciscarbopalladiazione'.

L'inserzione secondo la modalità " α,α " viene subita da CO. Il suo inserimento ad un legame carbonio-Pd offre complessi di acilpalladio variamente sostituiti.

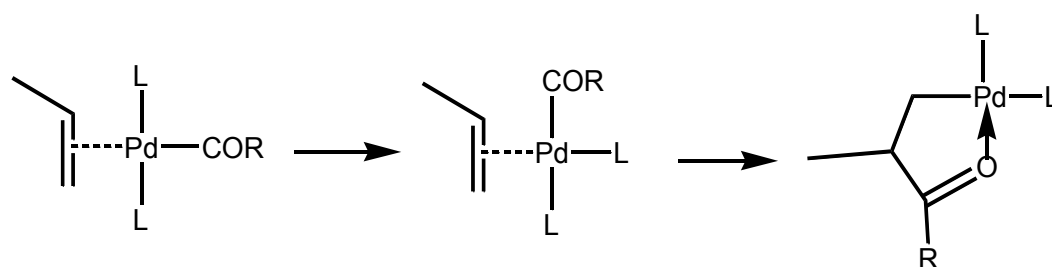


Figura 1.6

Transmetallazione:

I complessi del palladio, ottenuti per addizione ossidativa, reagiscono con gli organometalli e gli idruri metallici. In questo contesto il gruppo organico o l'idruro viene trasferito al Pd, mediante un processo che prende il nome di transmetallazione. Essa ha luogo se esiste una differenza di elettronegatività tra i due metalli e se l'altro metallo è più elettropositivo del Pd. (Figura 1.7)

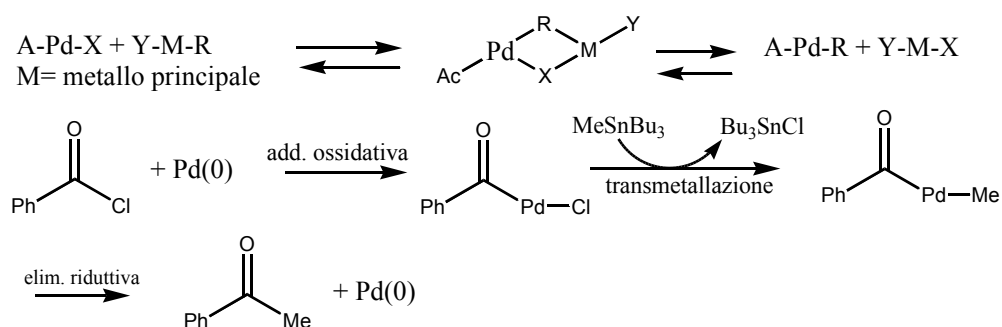


Figura 1.7

Eliminazione riduttiva:

L'eliminazione riduttiva presuppone la perdita di due ligandi in configurazione cis dal Pd, e dalla loro combinazione si ottiene un unico prodotto e Pd(0). La specie di Palladio così generata può subire così una nuova addizione ossidativa.

Ad esempio, in una reazione di carbonilazione, il complesso di acilpalladio, ottenuto per inserzione di CO, subisce eliminazione riduttiva per dare un chetone e Pd(0). (Figura 1.8)

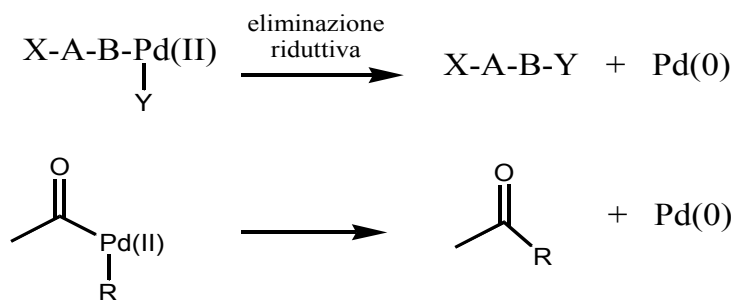


Figura 1.8

Un elemento fondamentale affinché la reazione abbia luogo è l'uso di complessi cis, infatti se i gruppi da eliminare sono in trans, devono prima riassetarsi a cis. L'eliminazione riduttiva di specie con legami Pd-C sp^2 è più veloce di quella di specie con legami Pd-C sp^3 .

beta eliminazione di idruro:

Questo processo insieme all'eliminazione riduttiva e alla beta eliminazione di idruri rappresenta un altro metodo per ottenere la chiusura di un ciclo catalitico Pd promosso. Esso consiste nella sin eliminazione di idrogeno da un carbonio posto in posizione β in complessi di alchilpalladio, e porta alla formazione di un alchene e di una specie H-Pd-X.^[7]

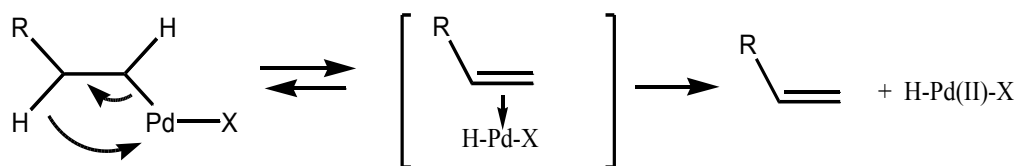


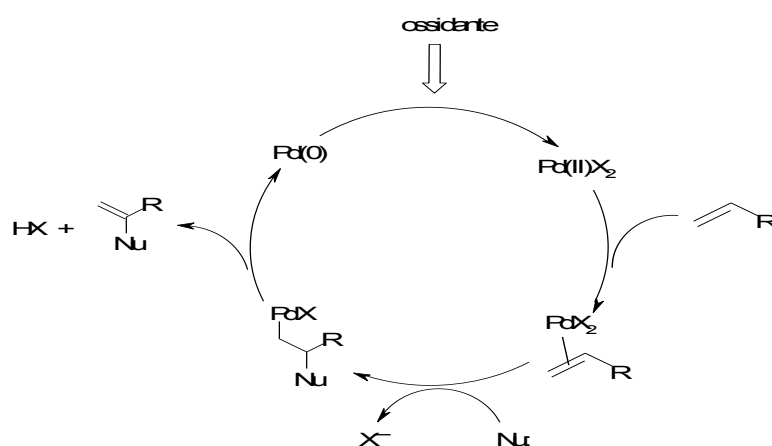
Figura 1.9

1.1.2 Reazioni catalizzate da Pd(II)

In letteratura sono note reazioni in cui i composti di palladio sono impiegati in quantità stechiometrica o catalitica. Chiaramente la seconda tipologia risulta vantaggiosa sia in termini economici che di impatto ambientale.

Tra le reazioni promosse da palladio, quelle in cui il metallo si trova nello stato di ossidazione (II) risultano particolarmente interessanti perché consentono di funzionalizzare i sistemi olefinici senza la necessità che essi presentino legami attivati. Il metallo è quindi in grado di dare reazioni di omo- o eterocoupling intervenendo su un più accessibile legame C-H.^[9]

In una tipica reazione promossa da Pd(II) il ciclo catalitico ha inizio con la coordinazione del metallo all'olefina. Il complesso π -olefinico risultante può subire un attacco nucleofilo, di solito sul carbonio più sostituito, a dare un complesso σ -alchilpalladio(II) che, tramite un processo di β -eliminazione, evolve a dare il prodotto finale. Il palladio, eliminato come Pd(0), rientra nel ciclo catalitico grazie alla presenza nell'ambiente di reazione di un ossidante che



rigenera la specie Pd(II).

Figura 1.10

A livello intramolecolare il processo di ciclizzazione determina la formazione di prodotti ciclici con doppi legami eso- o endociclici, a seconda della regioselettività dell'attacco nucleofilo che è fortemente dipendente dalla lunghezza e dalla tipologia della catena che unisce il doppio legame olefinico al nucleofilo.

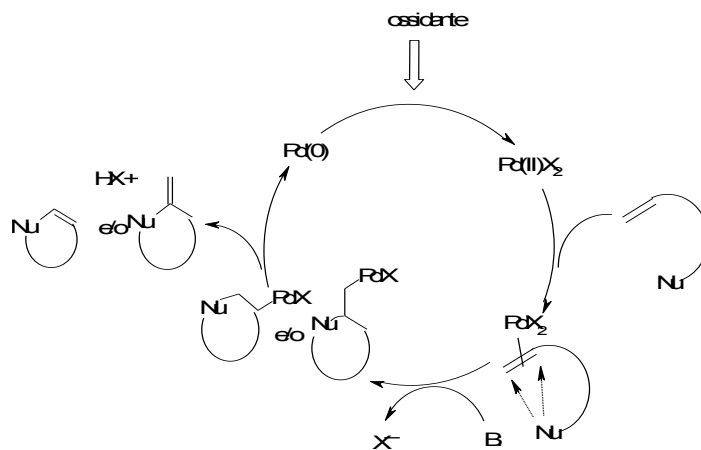


Figura 1.11

Nel 1959, i ricercatori del Wacker Chemie svilupparono un metodo Pd(II)-catalizzato per l'ottenimento di acetaldeide da etilene e acqua tramite un processo aerobico.

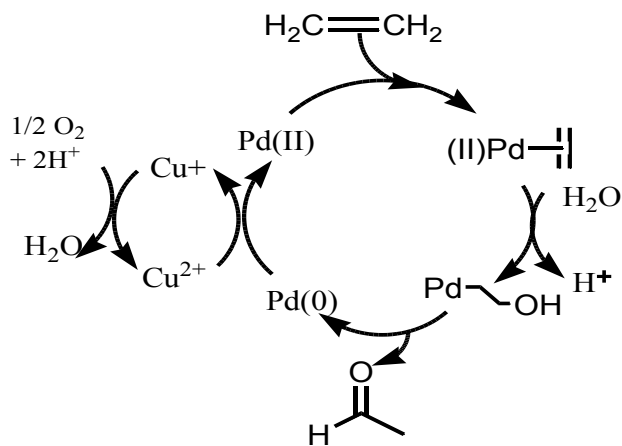


Figura 1.12

Questa reazione ha rappresentato il punto di partenza per lo sviluppo di numerose altre reazioni Pd(II) catalizzate. Tuttavia, il processo industriale Wacker deve il suo successo al riconoscimento che il catalizzatore può essere rigenerato da ossigeno molecolare in presenza di CuCl_2 .

La reazione procede attraverso la formazione di un intermedio β -idrossietil-Pd(II) intermedio, che evolve in un intermedio di alchil-Pd formato nella fase di nucleopalladiazione, esso può partecipare a un numero notevole di trasformazioni successive.^[10]

La nucleopalladiazione di un alchene spesso genera un nuovo centro stereogenico, ciononostante, questo tipo di funzionalizzazione Pd(II) mediata ha ottenuto meno successo di altre classi di trasformazioni enantioselettive.

Il processo Wacker, coinvolge l'ossidazione dell'etilene a acetalde e rappresenta l'esempio più evidente di una reazione catalitica che procede attraverso la nucleopalladiazione di un alchene, chiamata ossipalladiazione.^[11]

Un altro tipo di palladiazione è l'amminopalladiazione, che invece ha luogo quando i complessi olefinici Pd(II) reagiscono con nucleofili amminici per generare nuovi legami C-N.^[12]

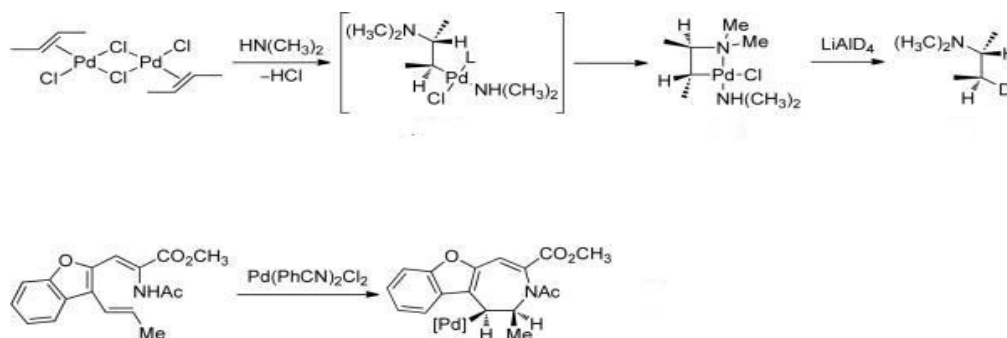
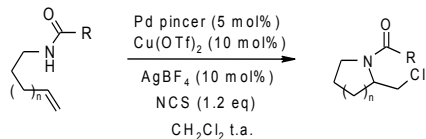
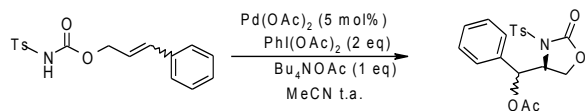
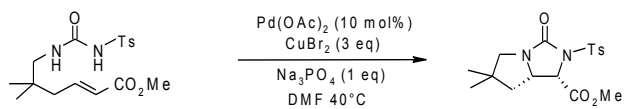
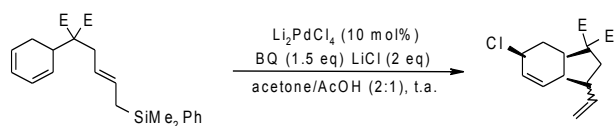
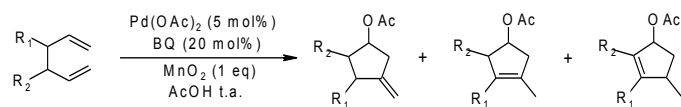
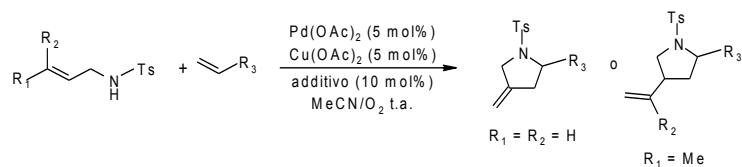


Figura 1.13

Le reazioni promosse da Pd(II) permettono anche reazioni a cascata che coinvolgono la formazione in sequenza di due legami, carbonio-carbonio/carbonio-eteroatomo oppure carbonio-eteroatomo/carbonio-eteroatomo. In letteratura sono riportati esempi di reazioni di carboamminazione,^[13] carboossigenazione,^[14] carboalogenazione,^[15] diamminazione,^[16] amminoossigenazione^[17] e amminoalogenazione.^[18]

Figura 1.14



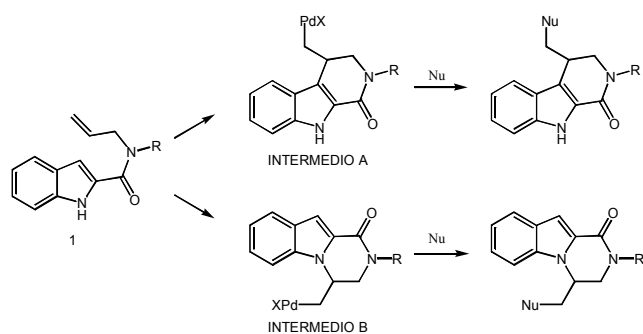
1.2 Scopo del lavoro

Da diversi anni la sintesi di molecole a scheletro indolico^[19] costituisce una delle finalità più avanzate per la produzione di prodotti organici ad alto valore aggiunto. Sostanze naturali e derivati della chimica fine, attivi biologicamente e farmacologicamente, presentano spesso strutture con anelli indolici sostituiti. In questi contesti risulta interessante la funzionalizzazione del nucleo indolico mediante reazioni ossidative Pd(II).^[20]

Qui vengono presentati i risultati di un progetto volto a sviluppare procedure domino per la ciclizzazione regioselettiva della 2-indolil allilammide (1) di derivati indolici come potenziali antagonisti serotoninergici, trombolitici, antidepressivi, ansiolitici, anticonvulsivanti e antistaminici.

Questa ricerca si basa sulla diversa nucleofilia delle posizioni C-3 e N-1 dell'indolo, che possono subire carbopalladiazione o amminopalladiazione di doppi legami carbonio-carbonio per dare, mediante un opportuno sistema catalitico, 3,4-diidro-beta-carbolinoni e pirazino[1,2-*a*]indoli variamente sostituiti (figura 1.15).

Figura 1.15



1.3 Risultati e discussione

La prima reazione di ciclizzazione domino è stata studiata usando la N-allilmetil indol-2-carbossamide (1a) ed utilizzando come idoneo sistema catalitico la coppia bimetallica $\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2$ (2) (5% mol) e CuCl_2 (3 equiv.), di solito efficaci in quelle reazioni domino che prevedono la formazione di un primo legame carbonio-carbonio o carbonio-eteroatomo ^[21].

Le reazioni sono state condotte usando lo stesso sistema catalitico in diversi solventi e temperature: in THF a temperatura ambiente è stata rilevata la conversione, in rese accettabili della N-allilmetil indol-2-carbossamide (1a) nel cloroderivato (3a) (Tabella 1). L'aumento della temperatura ha consentito miglioramenti sia in termini di tempo che di rese. Lo stesso risultato è stato osservato quando la reazione è stata condotta in metanolo o diossano. Al contrario, l'uso del DMF innesca un percorso competitivo di reazione fornendo l'estere formico (4a) accanto al cloroderivato (3a). Questo percorso domino insolito, coinvolge il solvente e si basa su una sequenza ossidativa Pd (II)-catalizzata. Il rapporto tra i prodotti di carboclorurazione e di carboesterificazione è varia ed è funzione della temperatura di reazione. In particolare, per riscaldamento della miscela di reazione a 150 °C il derivato (4a) è stato ottenuto con una resa del 87% mentre si sono ottenute solo tracce del cloro derivato (3a).

Schema 1

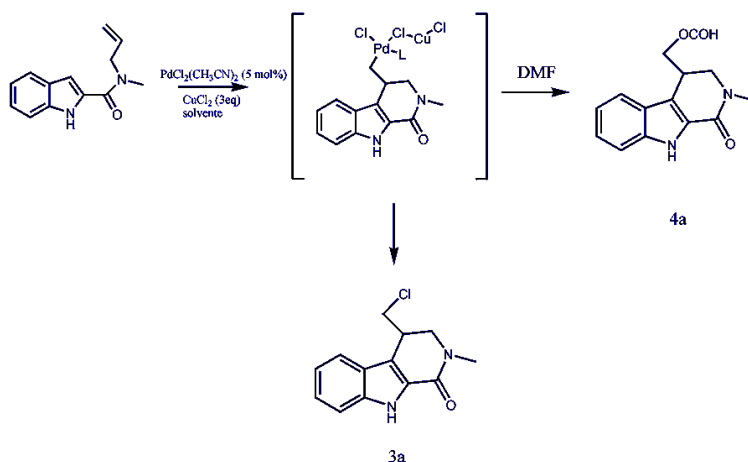


tabella 1 *Ottimizzazione delle condizioni selettive di reazione.*

	Solvente	T (°C)	t (h)	Conversione	Resa ^{a)} 3a (%)	Resa ^{a)} 4a (%)
1	THF	r.t.	3	100	65	
2	THF	reflux	2	100	92	
3	Diossano	reflux	2	100	81	
4	MeOH	reflux	3	100	70	
5	DMF	r.t.	72	30	20	7
6	DMF	60	3	100	61	29
7	DMF	100	3	100	68	33
8	DMF	150	3	100	2	87

a) Resa Isolata.

Per quanto riguarda gli aspetti meccanicistici della reazione, mentre la formazione del prodotto di cloroarilazione (3a) potrebbe essere prevedibile avendo precedenti nella letteratura,^[22] la formazione del composto (4a) è in qualche modo inaspettata.

La sequenza domino di arilazione/esterificazione coinvolge l'intervento del solvente ammidico nel determinare la struttura finale. Il complesso σ -alchilpalladio potrebbe essere stabilizzato tramite l'intervento di CuCl_2 che inibisce la più comune β -eliminazione, oppure tramite un complesso eterobimetallico σ -Pd/Cu (schema 1, L = DMF).^[23]

Nella seconda fase della ricerca le condizioni di reazione sopra riportate sono state saggiate su 2-indolil allilammidi diversamente sostituite al gruppo ammidico. In tutti i casi, l'esito della reazione è risultata coerente con i risultati ottenuti col substrato modello (1a).

Schema 2

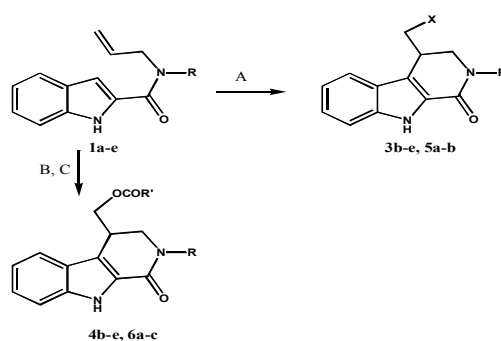


Tabella 2

	Substrato	Condizioni ^{a)}	Prodotti	Resa (%)
1	1b	<i>A</i>	3b X = Cl; R = cicloesil	82
2	1c	<i>A</i>	3c X = Cl; R = fenil	76
3	1d	<i>A</i>	3d X = Cl; R = allil	77
4	1e	<i>A</i>	3e X = Cl; R = ciclopentil	88
5	1a	<i>A</i>	5a X = Br; R = metil	78
6	1b	<i>A</i>	5b X = Br; R = cicloesil	71
7	1b	<i>B</i>	4b R = cicloesil; R' = H	84
8	1c	<i>B</i>	4c R = fenil; R' = H	73
9	1d	<i>B</i>	4d R = allil; R' = H	75
10	1e	<i>B</i>	4e R = ciclopentil; R' = H	86
11	1a	<i>C</i>	6a R = metil; R' = metil	65
12	1b	<i>C</i>	6b R = cicloesil; R' = metil	68
13	1c	<i>C</i>	6c R = fenil; R' = metil	62

- ^{a)} Condizioni *A*: **2** (5 mol%), CuX₂ (3 eq), THF, reflux; condizioni *B*: **2** (5 mol%), CuCl₂ (3 eq), DMF, 150 °C; condizioni *C*: **2** (5 mol%), CuCl₂ (3 eq), DMA, 150 °C.

E' riportato in tabella 2 che se i derivati indolici 1b-e vengono trattati in condizioni carboclorurative in presenza di THF come solvente, vengono ottenuti i corrispondenti prodotti 3b-e (voci 1-4). Quando si sostituisce il CuCl₂ con il CuBr₂, vengono isolati i bromoderivati 5a-b come prodotti finali (voci 5-6). Al contrario, usando le condizioni di cui alla voce 8 della tabella 1, le allilammidi 1b-e subiscono una sequenza domino di arilazione/esterificazione che porta alla formazione dei prodotti 4b-e. Se la reazione viene effettuata usando dimetilacetammide (DMA) come solvente, vengono ottenuti i corrispondenti acetato derivati 6a-c (voci 11-13). E' da notare che in queste condizioni i cloroderivati 3a-e non sono stati rilevati.

Schema 3

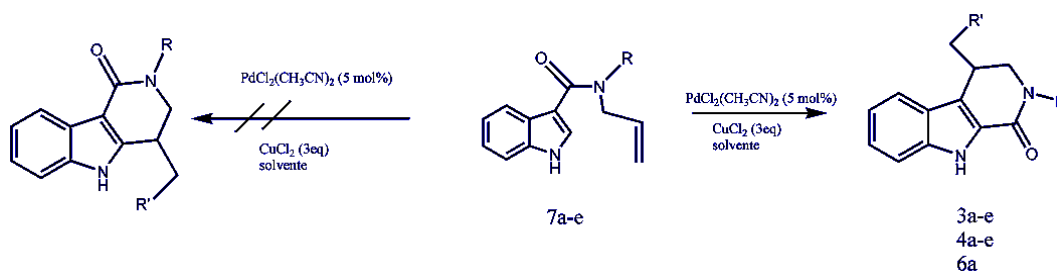
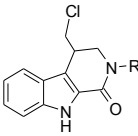
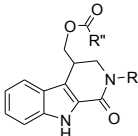


Tabella 3

	Substrato	Condizioni ^{a)}	Prodotti	Resa (%)
				
1	7a	<i>A</i>	3a R = metil	79
2	7b	<i>A</i>	3b R = cicloesil	75
3	7c	<i>A</i>	3c R = fenil	74
4	7d	<i>A</i>	3d R = allil	83
5	7e	<i>A</i>	3e R = ciclopentil	81
				
6	7a	<i>B</i>	4a R = metil; R'' = H	81
7	7b	<i>B</i>	4b R = cicloesil; R'' = H	72
8	7c	<i>B</i>	4c R = fenil; R'' = H	69
9	7d	<i>B</i>	4d R = allil; R'' = H	81
10	7e	<i>B</i>	4e R = ciclopentil; R'' = H	70
11	7a	<i>C</i>	6a R = metil; R'' = metil	73

^{a)} Condizioni *A*: **2** (5 mol%), CuCl₂ (3 eq), THF, reflux; condizioni *B*: **2** (5 mol%), CuCl₂ (3 eq), DMF, 150 °C; condizioni *C*: **2** (5 mol%), CuCl₂ (3 eq), DMA, 150 °C.

Al fine di ottenere γ -carboline diversamente funzionalizzate si è pensato di trattare le allilammidi dell'acido 3-indol carbossilico **7a-e** secondo le modalità alle voci 2 e 8 della tabella 1. Sono stati così ottenuti i composti **3a-e** e **4a-e**, che erano già stati ottenuti a partire dalle allilammidi dell'acido 2-indol carbossilico (voci 1-10, Tabella 3). Il trattamento del derivato ammidico (**7a**) con (2) come catalizzatore e CuCl₂ (3 equiv) in DMA a 150 ° C ha confermato il comportamento osservato in precedenza, infatti ha portato all'ottenimento del prodotto (**6a**) (voce n. 11, tabella 3).

L'isolamento dei prodotti riarrangiati **3a-e**, **4a** e **6a-e** suggerisce che la ciclizzazione degli indoli C-3 sostituiti, catalizzata dal sistema 2/CuCl₂, sia il risultato dell'iniziale formazione di un legame C-C a C-3 seguito da una 1,2-migrazione della porzione acilica per dare i prodotti finali,^[24] probabilmente passando attraverso la formazione di un intermedio spiro D, che subisce la

migrazione selettiva dell'acile prima o dopo l'eliminazione del metallo (Figura 1.16).

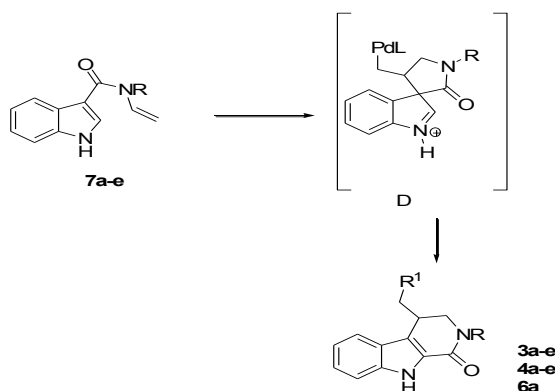


Figura 1.16

In una seconda fase, avendo in mente un percorso regioselettivo opposto, ossia all'azoto indolico, si è cercato di sviluppare un nuovo protocollo per l'ottenimento di pirazino [1,2 *a*]indoli. A tal fine, le allilammidi 1a-d sono stati state trattate con **2** (5% mol) e un sale di rame (II) (5 equiv) in presenza di K₂CO₃ (1 equiv). Le reazioni procedono pulite fornendo i pirazino [1,2-*a*] indoli 8a-e e 9a-d in buone rese. L'acetonitrile (MeCN) si è dimostrato il miglior solvente, mentre la DMF e il diossano permettono la formazione dei prodotti dialogenati in tracce.

Schema 4

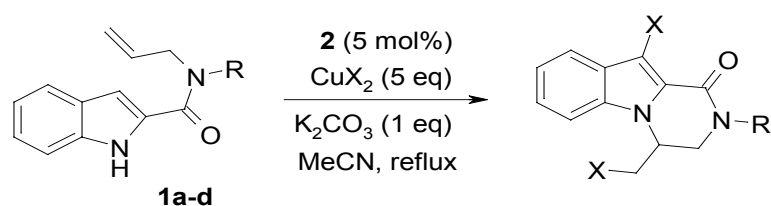


Tabella 4.

	Substrato	Prodotti	resa ^{a)} (%)
1	1a	8a X = Cl; R = metal	91
2	1b	8b X = Cl; R = cicloesil	85
3	1c	8c X = Cl; R = fenil	81
4	1d	8d X = Cl; R = allil	83
5	1a	9a X = Br; R = metal	73
6	1b	9b X = Br; R = cicloesil	75
7	1c	9c X = Br; R = fenil	71

a) Resa isolata

1.4 Conclusioni

Sono state sviluppate efficienti e pratiche reazioni domino mediate dalla coppia $\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2/\text{CuX}_2$ che forniscono l'accesso rapido e selettivo a β -carbolinoni e pirazino [1,2-*a*] indoli variamente funzionalizzati. Tra questi il processo ossidativo Pd (II)-catalizzato, la via che porta direttamente agli esteri formico o acetico, rappresenta un primo esempio di evoluzione di un complesso σ -alchil-palladio per mezzo di DMF o DMA utilizzati come solventi. Mentre, i pirazino [1,2-*a*] indoli sono stati ottenuti solo da 2-indolil allilammidi, i derivati β -carbolinonici sono stati ottenuti a partire sia da 2- che da 3-indolil allilammidi. E' da mettere in evidenza che gli indoli così ottenuti saranno oggetto di screening biologico per accertarne le loro eventuali attività farmacologiche.

1.5 Parte sperimentale

Reagenti e solventi sono stati utilizzati come ricevuti da fonti commerciali. La cromatografia Flash su colonna è stata effettuata utilizzando gel di silice 230 400 mesh. La cromatografia analitica su strato sottile è stata eseguita su gel di silice 60 F254. I punti di fusione sono stati misurati con un apparecchio Büchi B-540 e sono corretti. Gli spettri IR sono stati registrati su uno spettrofotometro FT-IR. Gli spettri di risonanza magnetica nucleare sono stati acquisiti su uno spettrometro AVANCE Bruker 400 operante a 400MHz per ^1H NMR e 100 Mhz per ^{13}C NMR. Gli Spettri di massa sono stati determinati su uno strumento HPLC-MS-LCQ Advantage Thermo Finnigan. Le analisi elementari sono state eseguite su un Perkin-Elmer CHNAnalyzer Series II 2400.

Procedura generale per la preparazione delle 2-indolil allilammidi (1a-e)

Una soluzione di acido indol-2-carbossilico (1,2 mmol) in CH_2Cl_2 anidro (40 ml) è stata raffreddata a 0 °C e sono stati addizionati DCC (1,2 mmol), l'allilamina (1 mmol) e DMAP (0,015 mmol). La miscela viene agitata a t.a. per 48 ore. Trascorso questo tempo viene filtrata su celite. Il grezzo risultante è stato purificato mediante cromatografia Flash (Esano /AcOEt 7:3).

***N*-allil-*N*-metil *1H*-indolo-2-carbossamide (1a).**

I dati spettroscopici sono in accordo con quelli riportati in letteratura.^[25] Anal. Calc per $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$: C, 72,87; H, 6,59, N, 13,07. Trovato C 72,74; H, 6,63, N, 12,89.

***N*-allil-*N*-cicloesil *1H*-indolo-2-carbossamide (1b). -**

I dati spettroscopici sono riportati in letteratura^[25]. Anal. Calc. Per $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}$: C, 76,56; H, 7,85, N, 9,92. Trovato C 76,81; H, 7,97, N, 9,75.

***N*-allil-*N*-fenil *1H*-indolo-2-carbossamide (1c).**

I dati spettroscopici sono riportati in letteratura^[25]. anal. Calc. per $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$: C, 78,24; H, 5,84, N, 10,14. Trovato C 78,46; H, 5,57, N, 10,12.

***N, N*-diallil *1H*-indolo-2-carbossamide (1d).**

I dati spettroscopici sono riportati in letteratura ^[25]. anal. calc per C₁₅H₁₆N₂O: C, 74,97; H, 6,71, N, 11,66. Trovato C 74,77; H, 6,84, N, 11,82.

***N*-allil-*N*-ciclopentil *1H*-indolo-2-carbossamide (1e)**

Resa: 79%. Solido bianco. P. f. 145 ° C (iPr₂O). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0,92-2,12 (m, 8H), 4,18-4,26 (m, 2H), 4,81-5,02 (m, 1H), 5,27- 5.33 (m, 2H), 5,97-6,12 (m, 1H), 6,87 (s, 1H), 7,14 (dd, J = 7.9, 8.0 Hz, 1H), 7,28 (dd, J = 7.9, 8.3 Hz, 1H), 7,42 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7,65 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 9.30 (s br, 1H) ; ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 23.9 (T), 29,6 (t), 34.3 (t), 58,6 (D), 104,8 (d), 111,6 (d), 116,3 (s), 120,4 (t), 122,0 (d), 122,9 (d), 124,3 (d), 127,8 (s), 129,9 (s), 135,4 (d), 163,8 (s). IR: 3312, 1670 cm⁻¹. MS: m / z 268 (M⁺). Anal. calc per C₁₇H₂₀N₂O: C, 76,09; H, 7,51, N, 10,44. Trovato C 75,89; H, 7,67, N, 10,65.

Procedura generale per la preparazione delle 3-indolil allilammidi (7a-e)

Metodo A (7a-d) - Una soluzione di acido indol-3-carbossilico (1,2 mmol) in CH₂Cl₂ anidro(40 mL) è stata raffreddata a 0 °C e sono stati addizionati DCC (1,2 mmol), l'allilammina (1 mmol) e DMAP (0,015 mmol). La miscela è stata agitata a t.a. per 48 ore. Trascorso questo tempo è stata filtrata su celite. Il grezzo così ottenuto è stato purificato mediante cromatografia Flash.

Metodo B (7e) - Una soluzione di acido indol-3-carbossilico (1 mmol) e di ossalil cloruro (3 mmol) in CH₂Cl₂ anidro (30 ml) viene agitata a t.a. per 16 h. Il solvente è stato evaporato a pressione ridotta; al residuo, risolubilizzato in CH₂Cl₂ anidro (30 ml), è stata aggiunta a 0 °C l'allilammina (3 mmol). La soluzione viene agitata per 1 ora a temperatura ambiente, trascorso questo tempo viene estratta con HCl 1N (30 ml), con una soluzione satura di NaHCO₃ (30 ml) e due volte con acqua (2 x 30 ml). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄. Il grezzo così ottenuto viene purificato mediante cromatografia Flash.

***N*-allil-*N*-metil *1H*-indol-3-carbossammide (7a)** – Resa: 84%. eluente: Esano / AcOEt 02:03 solido bianco. P.f.136 ° C (iPr₂O). ¹H NMR (400 Mhz, CDCl₃) δ:

3.12 (s, 3H), 4.18 (d, J = 5.1 Hz, 2H), 5,25-5,32 (m, 2H), 5,85-5,92 (m, 1H), 7,19-7,23 (m, 2H), 7,30-7,33 (m, 2H), 7,84-7,87 (m, 1H), 9.17 (s br, 1H), ¹³C NMR (100 Mhz, CDCl₃) δ: 35.2 (q), 52,8 (t), 110,8 (s), 112,2 (d), 117,6 (t), 120,9 (d), 121,2 (d), 122,8 (d), 124,0 (d), 126,5 (s), 133,8 (d), 136,2 (s), 168,7 (s). IR: 3228, 1673 cm⁻¹. MS: m / z 214 (M⁺). Anal. calc per C₁₃H₁₄N₂O: C, 72,87; H, 6,59, N, 13,07. Trovato C 72,98; H, 6,47; N, 13,13.

***N*-allil-*N*-cicloesil *1H*-indol-3-carbossammide (7b)** – Resa: 68%. eluente: Esano / AcOEt 03:02 bianco solido. P.f. 129 °C (iPr₂O). ¹H NMR (400 Mhz, CDCl₃) δ: 0,85-1,81 (m, 10H), 4.14 (d, J = 3,5 Hz, 2H), 4,20-4,30 (m, 1H), 5,16-5,28 (m, 2H), 5,90-5,96 (m, 1H), 7,11-7,18 (m, 4H), 7,86 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 10,6 (s br, 1H), ¹³C NMR (100 Mhz, CDCl₃) δ: 25.5 (T), 25.9 (t), 26,0 (t), 26,3 (t), 32.2 (t), 34,1 (t), 49.1 (d), 110,7 (s), 112,5 (d), 116,2 (t), 120,4 (d), 120,8 (d), 122,6 (d), 124,8 (d), 126,9 (s), 132,0 (d), 136,4 (s), 169,0 (s). IR: 3001, 1665 cm⁻¹. MS: m / z 282 (M⁺). Anal. Calc per C₁₈H₂₂N₂O: C, 76,56; H, 7,85, N, 9,92. Trovato C 76,78; H, 7,92, N, 9,83.

***N*-allil-*N*-fenil *1H*-indol-3-carbossammide (7c)**: Resa -63%. eluente: Esano / AcOEt 03:02 bianco solido. P. f. 136 °C (iPr₂O). ¹H NMR (400 Mhz, CDCl₃) δ: 4.54 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 5.20 (dd, J = 9,9, 17,0 Hz, 2H), 5,97-6,10 (m, 1H), 7,16-7,44 (m, 8H), 8,25-8,27 (m, 1H), 9.19 (s br, 1H); ¹³C NMR (100 Mhz, CDCl₃) δ: 53.6 (T), 110,8 (d), 117,8 (t), 121,7 (d), 122,2 (d), 123,1 (d), 127,6 (d), 127,8 (s), 128,7 (d), 129,4 (d), 129,7 (d), 134,0 (d), 135,6 (s), 144,6 (d), 155,8 (s), 166,4 (s). IR: 3321, 1668 cm⁻¹. MS: m / z 276 (M⁺). Anal. Calc per C₁₈H₁₆N₂O: C, 78,24; H, 5,84, N, 10,14. Trovato C 78,10; H, 5,99, N, 10,26.

***N*, *N*-diallil *1H*-indol-3-carbossammide (7d)** - Resa: 41%.

eluente: Esano / AcOEt 01:01 bianco solido. P.f. 157 °C (iPr₂O). ¹H NMR (400 Mhz, CDCl₃) δ: 4.07 (d, J = 5.1 Hz, 4H), 5,18-5,23 (m, 4H), 5,87-5,96 (m, 2H), 7,09 (dd, J = 7.3, 8.0 Hz, 1H), 7.16 (dd, J = 7.3, 8.2 Hz, 1H), 7.44 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7,63 (d, J = 2.7 Hz, 1 H), 7,79 (d, J = 8.0 Hz, 1 H), 11.50 (s br, 1H); ¹³C NMR (100 Mhz, DMSO-d₆) δ: 39.8 (T), 110,1 (s), 112,7 (d), 117,6 (t), 121,0 (d),

121,5 (d), 122,8 (d), 127,3 (d), 127,6 (s), 135,2 (d), 136,5 (s), 167,1 (s). IR: 3328, 1670 cm⁻¹. MS: m / z 240 (M⁺). Anal. Calc per C₁₅H₁₆N₂O: C, 74,97; H, 6,71, N, 11,66. Trovato C 74,77; H, 6,84, N, 11,82.

***N*-allil-*N*-ciclopentil 1*H*-indol-3-carbossammide (7e)** -Resa: 94%. eluente: Esano / AcOEt 01:01 bianco solido. P.f. 112 °C (*i*Pr₂O). ¹H NMR (400 Mhz, CDCl₃) δ: 1,32-1,94 (m, 8H), 4,09-4,11 (m, 2H), 4,60-4,68 (m, 1H), 5,18-5,27 (m, 2H), 5,94-6,03 (m, 1H), 7,13-7,25 (m, 4H), 7,79-7,84 (m, 1H), 9,43 (s br, 1H), ¹³C NMR (100 Mhz, CDCl₃) δ: 24,5 (t), 25,4 (t), 26,0 (t), 30,3 (t), 34,3 (t), 49,5 (d), 112,0 (d), 112,1 (s), 116,0 (t), 120,7 (d), 121,1 (d), 122,9 (d), 125,6 (d), 126,6 (s), 136,1 (s), 136,3 (d), 168,7 (s). IR: 3321, 1668 cm⁻¹. MS: m / z 268 (M⁺). Anal. Calc per C₁₇H₂₀N₂O: C, 76,09; H, 7,51, N, 10,44. trovato C, 75,96; H, 7,63, N, 10,32.

Procedura generale per le reazioni di arilazione / alogenazione (condizioni A)

Una soluzione di 2-indolil allilammide (1 mmol), PdCl₂(MeCN)₂ (0.05 mmol) e CuX₂ (3 mmol) in THF (5 ml) viene portata a riflusso per 2h. Dopo raffreddamento, il solvente è stato evaporato a pressione ridotta, ed è stata aggiunta una soluzione satura di NaCl (10 ml), la miscela risultante è stata estratta con CH₂Cl₂ (3 x 20 ml). La fase organica è stata anidrificata su Na₂SO₄, il solvente è stato evaporato a pressione ridotta. I prodotti sono stati purificati mediante cromatografia flash.

4-(clorometil)-2-metil-2,3,4,9-tetraidro-pirido [3,4-*b*] indol-1-one (3a) – Resa: 92%. Eluente: Esano/AcOEt 1:1. Solido arancio pallido. P. f. 166 °C (*i*Pr₂O). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.24 (s, 3H), 3.49-3.53 (m, 1H), 3.62 (t, *J* = 11.0 Hz, 1H), 3.80 (dd, *J* = 3.8, 11.0 Hz, 1H), 3.87 (dd, *J* = 2.3, 12.9 Hz, 1H), 3.97 (dd, *J* = 5.3, 12.9 Hz, 1H), 7.20 (dd, *J* = 7.5, 7.8 Hz, 1H), 7.35 (dd, *J* = 7.5, 8.2 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 9.99 (s br, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 34.8 (q), 35.5 (d), 44.7 (t), 52.0 (t), 113.4 (d), 117.7 (s), 120.1 (d), 121.1 (d), 125.0 (s), 125.4 (d), 127.5 (s), 138.1 (s), 161.5 (s). IR: 3432, 1667 cm⁻¹. MS: *m/z* 248 (M⁺). Anal. calc per C₁₃H₁₃ClN₂O: C, 62,78; H, 5,27; N, 11,26.

Trovato C, 62.83; H, 5.43; N, 11.40.

4-(clorometil)-2-cicloesil-2,3,4,9-tetraidro-pirido [3,4-*b*] indol-1-one (3b) - Resa: 82%. Eluente: Esano/AcOEt 8:2. Solido giallo chiaro. P. f. 224 °C (*i*Pr₂O). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.91-2.00 (m, 10H), 3.37-3.43 (m, 2H), 3.61-3.71 (m, 2H), 3.96 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H), 4.66-4.72 (m, 1H), 7.18 (dd, *J* = 7.4, 7.9 Hz, 1H), 7.32 (dd, *J* = 7.4, 8.3 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.62 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 10.39 (br s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 25.9 (t), 26.1 (t), 30.1 (t), 30.4 (t), 31.1 (t), 35.2 (d), 43.8 (t), 43.9 (t), 52.1 (d), 113.3 (d), 117.3 (s), 120.0 (d), 121.0 (d), 124.7 (s), 125.3 (d), 128.1 (s), 138.1 (s), 160.5 (s). IR: 3427, 1661 cm⁻¹. MS: *m/z* 316 (M⁺). Anal. calc per C₁₈H₂₁ClN₂O: C, 68.24; H, 6.68; N, 8.84. trovato C, 68.21; H, 6.51; N, 8.73.

4-(clorometil)-2-fenil-2,3,4,9-tetraidro-pirido [3,4-*b*] indol-1-one(3c) - Resa: 76%. Eluente: Esano/AcOEt 65:35. solido giallo. P. f. 206 °C (*i*Pr₂O). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.59-3.62 (m, 1H), 3.80 (t, *J* = 10.7 Hz, 1H), 3.89 (dd, *J* = 4.0, 10.7 Hz, 1H), 4.32 (dd, *J* = 1.8, 12.8 Hz, 1H), 4.41 (dd, *J* = 4.5, 12.8 Hz, 1H), 7.21 (dd, *J* = 7.5, 8.0 Hz, 1H), 7.37-7.39 (m, 3H), 7.49-7.54 (m, 4H), 7.68 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 10.63 (br s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 35.9 (d), 44.4 (t), 53.6 (t), 113.5 (d), 118.7 (s), 120.3 (d), 121.2 (d), 124.8 (s), 125.8 (d), 126.4 (d), 127.2 (d), 127.7 (s), 129.5 (d), 138.3 (s), 142.4 (s), 160.6 (s). IR: 3442, 1675 cm⁻¹. MS: *m/z* 310 (M⁺). Anal. Calc per C₁₈H₁₅ClN₂O: C, 69.57; H, 4.86; N, 9.01. Trovato C, 69.41; H, 5.09; N, 9.23.

2-allil-4-(clorometil) -2,3,4,9-tetraidro-pirido [3,4-*b*] indol-1-one(3d) - Resa: 77%. Eluente: Esano/AcOEt 7:3. Solido giallo chiaro. P. f. 171 °C (*i*Pr₂O). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.49-3.54 (m, 1H), 3.60 (t, *J* = 10.8 Hz, 1H), 3.79 (dd, *J* = 3.7, 10.8 Hz, 1H), 4.18 (dd, *J* = 6.4, 15.0 Hz, 1H), 4.48 (dd, *J* = 6.0, 15.0 Hz, 1H), 5.35 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 5.40 (dd, *J* = 1.1, 17.1 Hz, 1H), 5.92-6.00 (m, 1H), 7.20 (dd, *J* = 7.3, 8.0 Hz, 1H), 7.35 (dd, *J* = 7.3, 8.3 Hz, 1H), 7.57 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.65 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 11.05 (br s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ□ 35.5 (d), 44.5 (t), 49.3 (t), 113.6 (d), 117.9 (s), 119.1 (t), 120.1 (d), 121.0 (d),

124.9 (s), 125.4 (d), 127.5 (s), 133.2 (d), 138.3 (s), 161.1 (s). IR: 3455, 1668 cm^{-1} . MS: m/z 274 (M^+). Anal. calc per $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}$: C, 65.57; H, 5.50; N, 10.20. trovato C, 65.55; H, 5.31; N, 10.36.

4-(clorometil)-2-ciclopentil-2,3,4,9-tetraidro-pirido [3,4-*b*]indol-1-one (3e) - Resa: 88%. Eluente: Esano/AcOEt 8:2. solido bianco. P. f. 209 °C (*i*Pr₂O). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.70-2.07 (m, 8H), 3.45-3.55 (m, 2H), 3.74-3.90 (m, 2H), 3.91 (d, $J = 13.3$ Hz, 1H), 5.31-5.35 (m, 1H), 7.19 (dd, $J = 7.5, 8.0$ Hz, 1H), 7.35 (dd, $J = 7.5, 8.3$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.64 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 11.08 (s br, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 24.9 (t), 25.2 (t), 28.6 (t), 30.2 (t), 35.3 (d), 43.9 (t), 44.0 (t), 53.8 (d), 113.5 (d), 117.3 (s), 120.0 (d), 121.0 (d), 124.8 (s), 125.3 (d), 128.1 (s), 138.3 (s), 161.2 (s). IR: 3439, 1671 cm^{-1} . MS: m/z 302 (M^+). Anal. calc per $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{O}$: C, 67.43; H, 6.32; N, 9.25. trovato C, 67.55; H, 6.05; N, 9.12.

4-(bromometil)-2-metil-2,3,4,9-tetraidro-pirido[3,4-*b*]indol-1-one(5a) - Resa: 78%. Eluente: Esano/AcOEt 1:1. solido bianco. P. f. 202 °C (*i*Pr₂O). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 3.29 (s, 3H), 3.49-3.51 (m, 1H), 3.52-3.55 (m, 1H), 3.61-3.65 (m, 1H), 3.80-3.85 (m, 1H), 3.91-3.99 (m, 1H), 7.27 (dd, $J = 7.8, 7.0$ Hz, 1H), 7.39 (dd, $J = 7.0, 8.2$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.61 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 10.5 (s br, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 32.7 (t), 34.6 (q), 35.1 (d), 52.9 (t), 113.3 (d), 119.2 (s), 119.7 (d), 121.1 (d), 124.1 (s), 125.1 (s), 125.8 (d), 126.7 (s), 161.0 (s). IR: 3437, 1660 cm^{-1} . MS: m/z 293 (M^+). Anal. Calc per $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{BrN}_2\text{O}$: C, 53.26; H, 4.47; N, 9.56. trovato C, 53.44; H, 4.65; N, 9.77.

4-(bromometil)-2-cicloesil-2,3,4,9-tetraidro-pirido [3,4-*b*]indol-1-one (5b) - Resa: 71%. Eluente: Esano/AcOEt 8:2. Solido giallo chiaro. P. f. 209 °C (*i*Pr₂O). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.10-2.97 (m, 10H), 3.31-3.41 (m, 1H), 3.47-3.51 (m, 1H), 3.58-3.63 (m, 1H), 3.71-3.79 (m, 1H), 3.91-4.08 (m, 1H), 4.61-4.75 (m, 1H), 7.20 (dd, $J = 7.1, 8.0$ Hz, 1H), 7.35 (dd, $J = 1.1, 7.1$ Hz, 1H), 7.50 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 10.00 (s br, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 26.1 (t), 31.2 (t), 32.1 (t), 33.2 (t), 35.1 (d), 45.3 (t), 51.9 (d), 113.1 (d), 117.2

(s), 120.1 (d), 121.1 (d), 124.9 (s), 125.2 (d), 127.7 (s), 137.5 (s), 158.0 (s). IR: 3441, 1668 cm^{-1} . MS: m/z 361 (M^+). Anal. calc per $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{BrN}_2\text{O}$: C, 59.84; H, 5.86; N, 7.75. trovato C, 59.68; H, 5.99; N, 7.64.

Procedura generale per le reazioni di arilazione / esterificazione (condizioni B)

Una soluzione di 2-indolil allilammide (1 mmol), $\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2$ (0.05 mmol) e CuCl_2 (3 mmol) in DMF (5 mL) viene portata a riflusso per 3 ore. Dopo il aver raffreddato, è stata aggiunta una soluzione satura di NaCl (10 ml) e viene estratta con Et_2O (3x20 mL). La fase organica è stata anidrificata su Na_2SO_4 , il solvente è stato evaporato a pressione ridotta. I prodotti sono stati purificati mediante cromatografia flash.

(2-metil-1-osso-2,3,4,9-tetraidro-pirido [3,4-*b*] indol-4-il) metil formiato (4 a)

- Resa: 87%. Eluente: Esano/AcOEt 1:1. solido arancio chiaro. P. f. 129 °C (*i*Pr₂O). ¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 3.23 (s, 3H), 3.56-3.65 (m, 2H), 3.97 (dd, $J = 5.2, 10.1$ Hz, 1H), 4.26 (t, $J = 10.1$ Hz, 1H), 4.53 (dd, $J = 4.7, 11.2$ Hz, 1H), 7.18 (dd, $J = 7.3, 7.9$ Hz, 1H), 7.34 (t, $J = 7.3, 8.2$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.67 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.15 (s, 1H), 9.97 (br s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 32.4 (d), 34.8 (q), 52.0 (t), 63.7 (t), 113.5 (d), 117.2 (s), 120.3 (d), 120.9 (d), 125.3 (d), 125.4 (s), 127.7 (s), 137.9 (s), 161.2 (s), 161.8 (s). IR: 3421, 1658, 1730 cm^{-1} . MS: m/z 258 (M^+). Anal. calc per $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$: C, 65.11; H, 5.46; N, 10.85. Trovato C, 65.24; H, 5.21; N, 11.04.

(2-cicloesil-1-osso-2,3,4,9-tetraidro-pirido [3,4-*b*] indol-4-il)metil formiato

(4b) - Resa: 84%. Eluente: Esano/AcOEt 8:2. solido giallo chiaro. P. f. 179 °C (*i*Pr₂O). ¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.17-1.92 (m, 10H), 3.52-3.56 (m, 1H), 3.69-3.79 (m, 2H), 4.11 (t, $J = 10.2$ Hz, 1H), 4.51 (dd, $J = 4.7, 11.1$ Hz, 1H), 4.69-4.71 (m, 1H), 7.18 (dd, $J = 7.5, 7.8$ Hz, 1H), 7.33 (dd, $J = 7.5, 8.2$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.67 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.16 (s, 1H), 10.30 (br s, v); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 26.0 (t), 26.2 (t), 30.1 (t), 30.5 (t), 31.0 (t), 32.0 (d), 43.8 (t), 51.9 (d), 63.1 (t), 113.1 (d), 116.3 (s), 120.4 (d), 121.0 (d), 125.1 (s), 125.2 (d), 128.4 (s), 138.0 (s), 160.6 (s), 161.1 (s). IR: 3425, 1650, 1718 cm^{-1} .

MS: m/z 326 (M^+). Anal. calc per $C_{19}H_{22}N_2O_3$: C, 69.92; H, 6.79; N, 8.58. trovato C, 69.65; H, 7.04; N, 8.72.

(2-fenil-1-osso-2,3,4,9-tetraidro-pirido [3,4-*b*] indol-4-il) metil formiato (4c) -

Resa: 73%. Eluente: Esano/AcOEt 65:35. Solido giallo chiaro. P. f. 143 °C (*i*Pr₂O). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.66-3.71 (m, 1H), 4.07 (dd, $J = 2.6, 12.7$ Hz, 1H), 4.34-4.44 (m, 2H), 4.65 (dd, $J = 4.8, 11.2$ Hz, 1H), 7.20 (dd, $J = 7.5, 7.8$ Hz, 1H), 7.28-7.40 (m, 5H), 7.46-7.54 (m, 2H), 7.71 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.12 (s, 1H), 10.93 (br s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 32.8 (d), 53.4 (t), 63.5 (t), 113.5 (d), 117.8 (s), 120.5, (d), 121.1 (d), 125.1 (s), 125.7 (d), 126.2 (d), 127.1 (d), 127.8 (s), 129.5 (d), 138.5 (s), 142.6 (s), 161.0 (s), 161.1 (s). IR: 3441, 1682, 1710 cm⁻¹. MS: m/z 320 (M^+). Anal. calc per $C_{19}H_{16}N_2O_3$: C, 71.24; H, 5.03; N, 8.74. trovato C, 71.27; H, 4.85; N, 8.59.

(2-allil-1-osso-2,3,4,9-tetraidro-pirido [3,4-*b*] indol-4-il)metil formiato(4d) -

Resa: 75%. Eluente: Esano/AcOEt 7:3. solido giallo chiaro. P. f. 113 °C (*i*Pr₂O). IR: 3432, 1678, 1728 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.57-3.61 (m, 1H), 3.66 (dd, $J = 2.5, 12.8$ Hz, 1H), 3.91 (dd, $J = 5.2, 12.8$ Hz, 1H), 4.16 (dd, $J = 6.5, 15.0$ Hz, 1H), 4.23 (t, $J = 10.1$ Hz, 1H), 4.44 (dd, $J = 5.9, 15.0$ Hz, 1H), 4.51 (dd, $J = 4.8, 11.1$ Hz, 1H), 5.30-5.37 (m, 2H), 5.88-5.97 (m, 1H), 7.19 (dd, $J = 7.5, 7.9$ Hz, 1H), 7.34 (dd, $J = 7.5, 8.2$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.14 (s, 1H), 10.91 (br s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 32.2 (d), 49.1 (t), 49.2 (t), 63.6 (t), 113.4 (d), 117.0 (s), 118.9 (t), 120.4 (d), 121.0 (d), 125.2 (s), 125.4 (d), 127.7 (s), 133.4 (d), 138.3 (s), 161.1 (s), 161.3 (d). MS: m/z 284 (M^+). Anal. calc per $C_{16}H_{16}N_2O_3$: C, 67.59; H, 5.67; N, 9.85. trovato C, 67.48; H, 5.91; N, 9.76.

(2-ciclopentil-1-osso-2,3,4,9-tetraidro-pirido[3,4-*b*]indol-4-il)metil formiato

(4e) - Resa: 86%. Eluente: Esano/AcOEt 8:2. solido giallo chiaro. P. f. 131 °C (*i*Pr₂O). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.62-2.01 (m, 8H), 3.55-3.58 (m, 1H), 3.67 (dd, $J = 2.5, 12.9$ Hz, 1H), 3.78 (dd, $J = 4.8, 12.9$ Hz, 1H), 4.10 (t, $J = 10.3$ Hz, 1H), 4.54 (dd, $J = 4.8, 10.3$ Hz, 1H), 5.26-5.31 (m, 1H), 7.17 (dd, $J = 7.4, 7.8$

Hz, 1H), 7.33 (t, $J = 7.4, 8.2$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.67 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.16 (s, 1H), 10.81 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 24.8 (t), 25.0 (t), 28.5 (t), 29.9 (t), 32.1 (d), 44.0 (t), 53.8 (d), 63.1 (t), 113.3 (d), 116.4 (s), 120.4 (d), 120.9 (d), 125.1 (s), 125.2 (d), 128.3 (s), 138.2 (s), 161.1 (s), 161.3 (s). IR: 3440, 1664, 1738 cm^{-1} . MS: m/z 312 (M^+). Anal. calc per $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$: C, 69.21; H, 6.45; N, 8.97. trovato C, 69.33; H, 6.28; N, 8.78.

Procedura generale per la reazione di arilazione /esterificazione(condizioni C)

Una soluzione di 2-indolil allilammide (1 mmol), $\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2$ (0.05 mmol) e CuCl_2 (3 mmol) in DMA (5 ml) è stata portata a riflusso per 3 ore. Dopo il raffreddamento, è stata aggiunta una soluzione satura di NaCl (10 ml) ed è stata estratta con Et_2O (3x20 mL). La fase organica è stata anidrificata su Na_2SO_4 poi il solvente è stato evaporato a pressione ridotta. I prodotti sono stati purificati mediante cromatografia flash .

(2-metil-1-osso-2,3,4,9-tetraidro-pirido [3,4-*b*] indol-4-il)metil acetato (6 a) - Resa: 65%. Eluente: Esano/AcOEt 1:1. Solido bianco. P. f. 196 °C (*i*Pr₂O). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.11 (s, 3H), 3.21 (s, 3H), 3.52-3.58 (m, 1H), 3.60 (dd, $J = 2.6, 12.7$ Hz, 1H), 3.96 (dd, $J = 5.3, 12.7$ Hz, 1H), 4.18 (dd, $J = 9.1, 11.1$ Hz, 1H), 4.44 (dd, $J = 5.3, 11.1$ Hz, 1H), 7.18 (dd, $J = 7.5, 7.8$ Hz, 1H), 7.33 (dd, $J = 7.5, 8.2$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 10.62 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 21.4 (d), 32.5 (q), 34.7 (q), 52.2 (t), 64.5 (t), 113.1 (d), 117.3 (s), 120.6 (d), 121.0 (d), 125.3 (s), 125.4 (d), 127.7 (s), 137.9 (s), 161.6 (s), 171.3 (s). IR: 3444, 1675, 1733 cm^{-1} . MS: m/z 272 (M^+). Anal. calc per $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$: C, 66.16; H, 5.92; N, 10.29. trovato C, 66.31; H, 5.84; N, 10.26.

(2-cicloesil-1-osso-2,3,4,9-tetraidro-pirido [3,4-*b*] indol-4-il) metil acetato(6b) - Resa: 68%. Eluente: Esano/AcOEt 8:2. Solido bianco. P. f. 151 °C (*i*Pr₂O). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.81-2.21 (m, 10H), 2.11 (s, 3H), 3.45-3.53 (m, 1H), 3.68-3.75 (m, 2H), 4.02-4.07 (m, 1H), 4.36-4.40 (m, 1H), 4.58-4.79 (m, 1H), 7.15 (dd, $J = 7.4, 8.3$ Hz, 1H), 7.30 (dd, $J = 7.4, 8.0$ Hz, 1H), 7.50 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.66 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 10.45 (s br, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 21.0

(q), 25.8 (t), 30.1 (t), 30.5 (t), 31.7 (d), 43.6 (t), 51.6 (d), 63.6 (t), 112.7 (d), 116.6 (s), 120.1 (d), 120.4 (d), 124.7 (d), 124.9 (s), 127.8 (s), 137.6 (s), 159.2 (s), 170.8 (s). IR: 3441, 1668, 1720 cm^{-1} . MS: m/z 340 (M^+). Anal. calc per $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$: C, 70.57; H, 7.11; N, 8.23. Trovato C, 70.62; H, 7.32; N, 8.07.

(2-fenil-1-osso-2,3,4,9-tetraidro-pirido [3,4-*b*] indol-4-il) metil acetato (6c) - Resa: 62%. Eluente: Esano/AcOEt 65:35. Solido giallo chiaro. P. f. 156 °C (*i*Pr₂O¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 2.07 (s, 3H), 3.58-3.69 (m, 1H), 4.02-4.04 (m, 1H), 4.27 (dd, $J = 9.1, 2.0$ Hz, 1H), 4.38-4.40 (m, 1H), 4.53-4.56 (m, 1H), 7.18-7.72 (m, 9H), 9.98 (s br, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 21.0 (q), 32.4 (d), 53.2 (t), 63.9 (t), 112.8 (d), 118.0 (s), 120.4 (d), 120.7 (d), 124.9 (s), 125.3 (d), 125.7 (d), 126.6 (d), 127.3 (s), 129.1 (d), 137.7 (s), 142.2 (s), 160.3 (s), 170.8 (s).). IR: 3427, 1667, 1730 cm^{-1} . MS: m/z 334 (M^+). Anal. calc per $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$: C, 71.84; H, 5.43; N, 8.38. Trovato C, 71.52; H, 5.56; N, 8.57.

Procedura generale per le reazioni di amminoalogenazione/alogenazione

Una soluzione di 2-indolil allilammide (1 mmol), PdCl₂(MeCN)₂ (0,05 mmol), CuX₂ (5 mmol) e K₂CO₃ (1 mmol) in MeCN (5 ml) è stata portata a riflusso per 3 ore. Dopo il raffreddamento, il solvente è stato evaporato a pressione ridotta, è stata aggiunta una soluzione satura di NaCl (10 ml) e la miscela è stata estratta con CH₂Cl₂ (3x20 mL). La fase organica è stata anidrificata su Na₂SO₄ e il solvente è stato evaporato a pressione ridotta. I prodotti sono stati purificati mediante cromatografia flash.

10-Cloro-4-(clorometil)-2-metil-3,4-diidro-pirazino [1,2-*a*]indol-1(2*H*)-one (8 a) - Resa: 91%. Eluente: Esano/AcOEt 2:1. Solido bianco. P. f. 151 °C (*i*Pr₂O). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 3.20 (s, 3H), 3.62-3.74 (m, 2H), 3.90 (dd, $J = 1.2, 13.2$ Hz, 1H), 4.04 (dd, $J = 4.0, 13.2$ Hz, 1H), 4.68-4.72 (m, 1H), 7.25 (dd, $J = 8.1, 8.2$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.42 (dd, $J = 8.2, 8.3$ Hz, 1H), 7.73 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 34.4 (q), 41.1 (t), 48.5 (t), 52.1 (d), 109.4 (d), 111.7 (s), 112.9 (s), 120.6 (d), 121.8 (d), 126.1 (s), 126.4 (d), 133.5 (s), 158.7 (s). IR: 1672 cm^{-1} . MS: m/z 282 (M^+). Anal. calc per $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$: C,

55.14; H, 4.27; N, 9.89. Trovato C, 55.36; H, 4.06; N, 9.78.

10-Cloro-4-(clorometil)-2-cicloesil-3,4-diidro-pirazino [1,2-*a*]indol-1(2*H*)-one

(8 b) - Resa: 85%. Eluente: Esano/AcOEt 7:3. Solido bianco. P. f. 163 °C (*i*Pr₂O). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.13-1.98 (m, 10H), 3.61-3.69 (m, 2H), 3.75-3.78 (m, 1H), 3.99-4.02 (m, 1H), 4.61-4.77 (m, 2H), 7.24-7.42 (m, 3H), 7.75 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 25.4 (t), 25.6 (t), 25.7 (t), 30.1 (t), 30.3 (t), 40.5 (t), 40.9 (t), 51.1 (d), 52.2 (d), 109.3 (d), 111.7 (s), 120.5 (d), 121.7 (d), 122.0 (s), 126.2 (s), 126.3 (d), 133.3 (s), 158.0 (s). IR: 1678 cm⁻¹. MS: *m/z* 350 (M⁺). Anal. calc per C₁₈H₂₀Cl₂N₂O: C, 61.55; H, 5.93; N, 7.97. trovato C, 61.45; H, 5.83; N, 8.12.

10-Cloro-4-(clorometil)-2-fenil-3,4-diidro-pirazino [1,2-*a*]indol-1 (2*H*)-one

(8c) - Resa: 81%. Eluente: Esano/AcOEt 65:35. Solido bianco. P. f. 197 °C (*i*Pr₂O). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.77 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H), 3.90 (dd, *J* = 10.3, 10.5 Hz, 1H), 4.31 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 4.44 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 4.76-4.82 (m, 1H), 7.27-7.46 (m, 8H), 7.78 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 41.1 (t), 50.1 (t), 52.5 (d), 109.5 (d), 113.0 (s), 120.7 (d), 121.7 (s), 121.9 (d), 125.7 (d), 126.2 (s), 126.8 (d), 127.1 (d), 129.3 (d), 133.7 (s), 141.1 (s), 157.8 (s). IR: 1673 cm⁻¹. MS: *m/z* 344 (M⁺). Anal. Calc per C₁₈H₁₄Cl₂N₂O: C, 62.62; H, 4.09; N, 8.11. Trovato C, 62.43; H, 4.18; N, 8.23.

2-allil-10-cloro-4-(clorometil)-3,4-diidro-pirazino [1,2-*a*]indol-1 (2*H*)-one (8d)

- Resa: 83%. Eluente: Esano/AcOEt 7:3. Olio giallo chiaro. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.60-3.68 (m, 2H), 3.90-3.93 (m, 2H), 4.00-4.06 (m, 1H), 4.41-4.48 (m, 1H), 4.62-4.73 (m, 1H), 5.31-5.38 (m, 2H), 5.81-5.93 (m, 1H), 7.26 (dd, *J* = 7.1, 7.9 Hz, 1H), 7.36 (dd, *J* = 7.1, 8.1 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 41.0 (t), 45.6 (t), 48.6 (t), 52.2 (d), 109.4 (d), 112.0 (s), 119.8 (t), 120.6 (d), 121.6 (s), 121.8 (d), 126.1 (s), 126.5 (d), 132.2 (d), 133.6 (s), 158.1 (s). IR: 1668 cm⁻¹. MS: *m/z* 308 (M⁺). Anal. calc per C₁₅H₁₄Cl₂N₂O: C, 58.27; H, 4.56; N, 9.06. Trovato C, 58.44; H, 4.25; N, 8.82.

10-Bromo-4-(bromometil)-2-metil-3,4-diidro-pirazino[1,2-*a*]indol-1(2*H*)-one (9a) - Resa: 73%. Eluente: Esano/AcOEt 1:1. Solido giallo chiaro. P. f. 141 °C (*i*Pr₂O). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.21 (s, 3H), 3.41-3.49 (m, 1H), 3.51-3.61 (m, 1H), 3.91-3.99 (m, 1H), 4.05-4.11 (m, 1H), 4.73-4.83 (m, 1H), 7.25 (dd, *J* = 8.1, 8.8 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.41 (dd, *J* = 8.1, 7.9 Hz, 1H), 7.71 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 28.7 (t), 34.6 (q), 49.0 (t), 52.1 (d), 97.4 (s), 109.6 (d), 120.6 (s), 121.7 (d), 121.9 (d), 123.0 (s), 126.4 (d), 134.2 (s), 158.8 (s). IR: 1665 cm⁻¹. MS: *m/z* 372 (M⁺). Anal. calc per C₁₃H₁₂Br₂N₂O: C, 41.97; H, 3.25; N, 7.53. Trovato C, 41.88; H, 3.44; N, 7.41.

10-Bromo-4-(bromometil)-2-cicloesil-3,4-diidro-pirazino[1,2-*a*]indol-1(2*H*)-one (9b) - Resa: 75%. Eluente: Esano/AcOEt 8:2. Solido arancio. P. f. 159 °C (*i*Pr₂O). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.72-2.12 (m, 10H), 3.43-3.55 (m 2H), 3.72-3.81 (m, 1H), 4.05-4.09 (m, 1H), 4.65-4.79 (m, 2H), 7.26-7.43 (m, 3H), 7.71 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 25.6 (t), 28.2 (t), 30.1 (t), 30.5 (t), 41.4 (t), 51.2 (d), 52.1 (d), 97.4 (s), 109.3 (d), 121.7 (d), 121.9 (d), 123.3 (d), 126.3 (s), 128.0 (s), 134.0 (s), 158.0 (s). IR: 1669 cm⁻¹. MS: *m/z* 440 (M⁺). Anal. calc per C₁₈H₂₀Br₂N₂O: C, 49.12; H, 4.58; N, 6.36. Trovato C, 49.25; H, 4.31; N, 6.40.

10-Bromo-4-(bromometil)-2-fenil-3,4-diidro-pirazino[1,2-*a*]indol-1(2*H*)-one (9c) - Resa: 71%. Eluente: Esano/AcOEt 65:35. Solido arancio chiaro. P. f. 164 °C (*i*Pr₂O). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.55-3.62 (m, 1H), 3.69-3.79 (m, 1H), 4.44-4.49 (m, 2H), 4.83-4.95 (m, 1H), 7.20-7.47 (m, 8H), 7.72-7.75 (m, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 28.5 (t), 50.5 (t), 52.5 (d), 98.1 (s), 109.5 (d), 121.8 (d), 122.1 (d), 125.8 (d), 126.8 (d), 127.3 (d), 128.0 (s), 129.3 (d), 132.7 (s), 134.3 (s), 141.1 (s), 157.9 (s). IR: 1658 cm⁻¹. MS: *m/z* 434 (M⁺). Anal. calc per C₁₈H₁₄Br₂N₂O: C, 49.80; H, 3.25; N, 6.45. Trovato C, 50.01; H, 3.02; N, 6.62.

Parte 2: Sintesi ed effetti antitumorali di ossazolo[3,4-a] pirazin-6 (3H)-oni.

2.1 introduzione

È noto che il cancro è una malattia caratterizzata dall'abnorme ed incontrollata proliferazione cellulare e rappresenta la principale causa di morte nelle nazioni più evolute. Esso insorge come risultato di una serie di mutazioni genetiche ed epigenetiche in seno alla cellula, responsabili di diverse alterazioni genetiche che coinvolgono geni che presiedono l'ordinaria e controllata divisione cellulare.^[26]

La cancerogenesi è caratterizzata dalla sregolazione del bilancio tra segnali di proliferazione e morte cellulare per apoptosi, con diminuzione di segnali proapoptotici (Fas, p53, Bax o Bad) e stimolazione di segnali antiapoptotici.

La sregolazione delle vie di trasduzione del segnale, del controllo del ciclo cellulare e di geni coinvolti nella morte cellulare, caratterizzano le cellule iniziate e influenzano la loro progressione verso la malignità. Mutazioni a carico di alcuni geni, trasmesse geneticamente, conferiscono predisposizione al cancro.

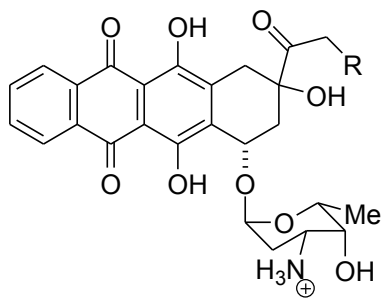
Il recettore per la transferrina (TfR1/CD71) è il principale mediatore dell'uptake cellulare di ferro che gioca un ruolo fondamentale nel controllo dell'omeostasi dei livelli intracellulari dello ione.^[27] È stato dimostrato che la sua espressione aumenta durante i processi di divisione cellulare ed in diversi tipi di tumore (gliomi, tumori al pancreas, al colon, leucemie, carcinoma della mammella, del polmone, della vescica e della cervice uterina).^[28] Tuttavia, non sono stati chiariti i meccanismi molecolari in cui è coinvolto il TfR nei tumori tiroidei, che rappresentano i più comuni tipi tumorali ad eziologia maligna a carico del sistema endocrino e la cui incidenza, soprattutto in Sicilia Orientale, e, prevalentemente nella zona etnea, è sempre più in aumento. Questi tumori sono particolarmente caratterizzati da un'elevata densità di membrana del TfR, che risulta essenziale al trasporto di ferro nelle cellule attivamente proliferanti, suggerendo che

l'espressione del Tfr sia effettivamente aumentata nelle cellule tumorali circolanti, nelle cellule progenitrici tumorali, o nelle cellule attivate durante la cancerogenesi. E' stato riportato che il Tfr è un target trascrizionale diretto del proto-oncogene c-MYC, una delle proteine più frequentemente disregolate nelle neoplasie maligne umane, sia in modelli *in vitro* che *in vivo* di linfoma a cellule B [29]. Inoltre, il Tfr è un bersaglio critico a valle di c-MYC, che risulta necessario alla proliferazione cellulare ed alla cancerogenesi. Il Tfr rappresenta un importante trasduttore dei suoi fattori di trascrizione implicati nella proliferazione del glioma ed aumenta la morte neuronale provocata dal glioma stesso, attivando la proteina chinasi attivata dal mitogeno ed Akt, e rendendo inattive la p21/cdkn1a e la proteina del retinoblastoma (pRB) [30]. La disattivazione di questi regolatori del ciclo cellulare facilita l'ingresso della cellula in fase S.

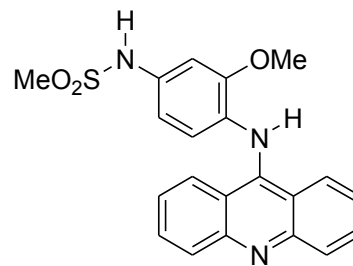
Diversi studi hanno fornito supporto sperimentale a terapie anticancro che utilizzano come target il Tfr [31].

La ricerca sullo sviluppo di nuovi farmaci non peptidici che interagiscono con il DNA è intensa ed attuale, poiché tali agenti hanno la potenzialità di interagire con il “*target*” per cui sono stati progettati senza aver bisogno di essere coadiuvati dalle peptidasi cellulari. [32] Tra i metodi di associazione farmaco-DNA conosciuti, il processo d'intercalazione è uno dei più realizzabili e diverse sostanze, sintetiche e naturali, che funzionano mediante questa tipologia d'azione, mostrano un'eccellente attività antitumorale.

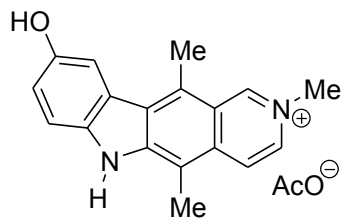
Esempi di tali sostanze includono le antracicline, come la daunomicina e l'adriamicina,^[32] le acridine, quale l'amsacrina,^[32] e le ellipticine, quali l'acetato di elliptinio^[33] e la camptotecina^[34] (Figura 2.1). La forza trainante per l'intercalazione risiede nell'energia di desolvatazione, che deriva dalla rimozione dell'agente intercalante dal mezzo acquoso, coadiuvata dalle forze di Van der



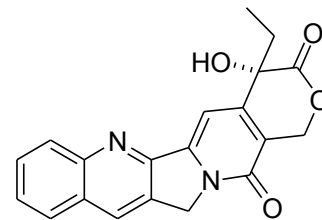
Daunomicina, R = H
Adriamicina, R = OH



Amsacrina



Acetato di elliptinio



Camptotecina

Waals che si instaurano fra il medesimo agente ed il DNA.

Figura 2.1

Il modo primario di azione di questi intercalanti sembra sia dato dalla possibilità di legarsi in modo reversibile al DNA nucleare provocando così l'inibizione del processo di replicazione e la morte cellulare. Numerosi studi biochimici, con l'ausilio della spettroscopia NMR e della cristallografia a raggi X, hanno indicato che la daunomicina e l'adriamicina si intercalano nella forma B della doppia elica ripiegata del DNA interagendo in modo specifico con la coppia di basi guanina-citosina d(CpG). Le coppie di basi al di sopra ed al di sotto del farmaco assumono una conformazione inarcata producendo una distorsione dell'elica del DNA che ne impedisce l'interazione con l'elicasi, la topoisomerasi e con le famiglie enzimatiche delle polimerasi, impedendo così di iniziare la sintesi dell'RNA.

Diversi fattori svolgono un ruolo importante nella stabilizzazione del complesso farmaco-DNA. Le antracicline sono stabilizzate dal legame idrogeno elettrostatico e dalle interazioni di sovrapposizione di legami π fra il cromoforo elettron-deficiente, cioè il chinone, e le nucleobasi. I legami ad idrogeno per esempio giocano un ruolo importante nella stabilizzazione del complesso; si è visto, infatti, che un'antraciclina priva del gruppo ossidrilico al C₉, nella parte destra dell'anello A non mostra attività anticancerogena.

Un'ampia varietà di sistemi ciclici planari può intercalarsi nel DNA, dando così origine a molti farmaci che possiedono l'attività chemioterapica. In questo contesto, sono stati progettati nuovi tipi di antitumorali intercalanti del DNA: in particolare, una serie di derivati policiclici aromatici contenenti catene laterali polari è stata studiata sistematicamente. L'attività antitumorale è stata scoperta in una classe di derivati dell'(1pirenilmetil)amminoalcol: gli studi di "binding" hanno mostrato che tutti questi derivati si legano al DNA per intercalazione.

Nello stesso contesto, è stata anche descritta la preparazione e la capacità intercalante di una serie di derivati del fenantrene, in cui la struttura della catena laterale è stata elaborata in un nucleo funzionalizzato del pirrolo[29].

2.1.1 Agenti intercalanti

Gli “Agenti Intercalanti” si distinguono dagli altri antitumorali per via del loro particolare comportamento. Queste molecole sono infatti in grado di interagire, o più esattamente di intercalarsi nella molecola del DNA provocando variazioni strutturali e funzionali tali da alterare profondamente il genoma cellulare. Queste alterazioni possono essere non letali, e quindi dare luogo a mutazioni che la cellula trasmetterà alla sua progenie, o letali, inducendo così il processo di apoptosi. È facile comprendere il notevole interesse che gli agenti intercalanti hanno e continuano a suscitare.

Vari sono gli aspetti ancora da chiarire per permettere inoltre un migliore sviluppo di farmaci di tale genere.

Da un punto di vista chimico gli intercalanti del DNA sono sistemi ciclici poliaromatici fusi costituiti da 3–6 anelli planari. Sono queste, infatti, le dimensioni più idonee del cromoforo per avere una più efficace azione intercalante. A questa struttura base possono essere legati dei sostituenti che, a seconda della loro natura, esercitano una forte influenza sull’affinità per il DNA, sulla geometria del complesso ligando-DNA e sulla selettività delle sequenze di basi. Essi possono essere semplici gruppi metilici, metossilici o amminici oppure lunghe catene laterali rappresentate da zuccheri, oligopeptidi, gruppi carbossamidici. Molto importante è il loro ruolo nello stabilizzare il complesso farmaco-DNA grazie alla loro capacità di dare luogo ad interazioni elettrostatiche o idrofobiche con i gruppi funzionali dell’acido nucleico. Si ritiene inoltre, che tali legami conferiscano la selettività di sequenza propria di molti agenti intercalanti quali l’adriamicina, la daunorubicina e l’actinomicina D (Figure 2.1 e 2.2).

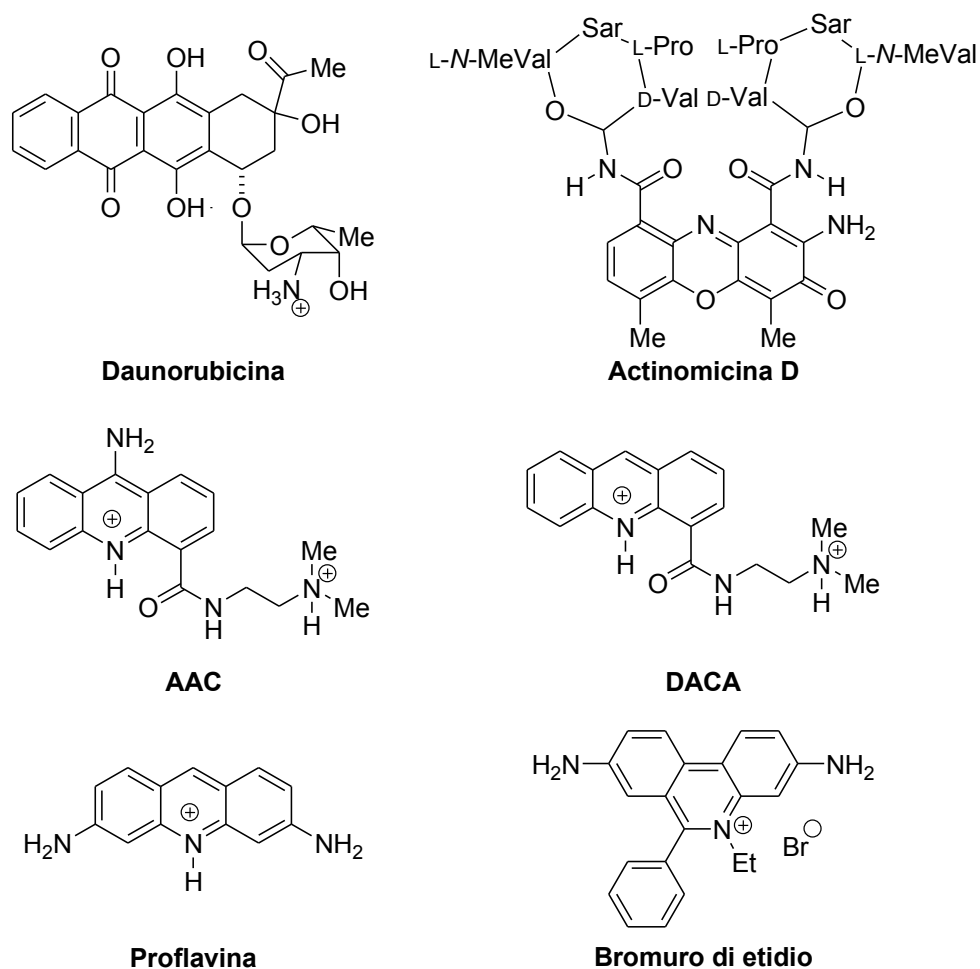


Figura 2.2

Le prime molecole di cui si scoprì l'azione intercalante sono rappresentate dal bromuro di etidio e dalla proflavina (Figura 2.2). Tra gli studi iniziali sono da ricordare quelli condotti da Lerman,^[35] il quale notò come, in seguito all'aggiunta di acridina, proflavina o acridina orange a DNA in soluzione, si aveva un notevole cambiamento del valore del coefficiente di viscosità e di sedimentazione del DNA. Questa osservazione lo portò a pensare che i farmaci provocavano una variazione strutturale della doppia elica con meccanismo di intercalazione. Secondo Lerman si aveva un allungamento della struttura del DNA che diventava anche più sottile (da qui gli effetti osservati sulla viscosità e sulla sedimentazione). La prima caratterizzazione biofisica di un complesso intercalante è avvenuta nel 1965 ad opera di Waring^[36] che, facendo ricorso alla spettroscopia

UV-visibile, descrisse l'interazione etidio-DNA mettendo tra l'altro in evidenza il ruolo della forza ionica nella genesi del complesso.

Sempre nello stesso anno si ebbe un'altra importante scoperta: Gellert e collaboratori dimostrarono che l'actinomicina D, un inibitore della trascrizione del DNA, forma un forte complesso con l'acido nucleico e che tale processo implica un notevole aumento di entropia e nessuna variazione di entalpia.^[37] Ciò fu attribuito alla distruzione dell'interazione farmaco-solvente. La descrizione delle proprietà biofisiche dell'actinomicina D legata al DNA fu effettuata nel 1968.^[38] L'anno prima, invece, Le Pecq e Paoletti, mediante la spettroscopia a fluorescenza, studiarono l'interazione etidio-DNA.^[39] A tutti questi studi hanno fatto seguito altri, su un numero sempre maggiore di molecole, con l'ausilio di tecniche quali la cristallografia a raggi X, l'NMR ad alta risoluzione, la spettroscopia e la spettrofluorimetria.

Ma in che maniera gli agenti intercalanti svolgono la loro azione? Il DNA è il depositario molecolare dell'informazione genetica di ogni cellula. La sua ossatura è costituita da un susseguirsi di deossiribonucleotidi uniti fra loro da ponti fosfodiesterici.

Ogni deossiribonucleotide è formato da una base azotata e da uno zucchero a 5 termini (il β -D-deossiribosio) il cui C_{5'} lega un gruppo fosfato. Mentre il pentosio fosfato ha una funzione puramente strutturale, le basi sono la sede dell'informazione genetica. Esse sono rappresentate da due purine, adenina (A) e guanina (G), e da due pirimidine, timina (T) e citosina (C). Come giustamente dedussero Watson e Crick nel loro studio pionieristico sul DNA, l'adenina si accoppia sempre con la timina e la guanina con la citosina e ciò in base a fattori sterici e di formazione di legami idrogeno. Perturbamenti o al contenuto di base e/o alla capacità dell'informazione genetica di essere identificata e letta da altre macromolecole, quali le proteine, producono marcati cambiamenti nelle proprietà funzionali e strutturali del DNA.

Questi effetti sono il frutto dell'interazione di piccole molecole con gli acidi

nucleici di cui viene bloccata la replicazione con notevoli conseguenze cellulari.

L'intercalazione comincia con il passaggio del ligando dall'ambiente acquoso circostante all'interno del DNA, tra le sue coppie di basi. È questo un trasferimento idrofobico termodinamicamente favorito poiché il farmaco non polare passa dalla soluzione acquosa in cui è disperso all'interno idrofobico dell'acido nucleico.

In conseguenza di ciò la macromolecola subisce una transizione conformazionale che le permetterà di accogliere, in una adatta cavità, il cromoforo. Per azione dell'enzima topoisomerasi II la doppia elica del DNA viene srotolata nel sito dove troverà posto il farmaco. È necessaria una separazione delle sue coppie di basi di circa 3,4 Å. Il processo di srotolamento nel punto di intercalazione varia, comunque, in funzione della geometria del ligando e può anche propagarsi sia a monte che a valle del punto interessato producendo in tal modo perturbazioni strutturali estese che compromettono la stabilità del DNA. Una volta che il farmaco si è inserito tra le basi, il complesso così generato si stabilizza mediante la formazione di interazioni non covalenti rappresentate da interazioni di Van der Waals, di tipo π e da legami idrogeno.^[40] Diversi studi hanno messo in evidenza come l'agente intercalante, affinché possa esercitare la sua attività antineoplastica, debba formare un complesso con il DNA e con la topoisomerasi II. È questo quanto si è osservato con l'*m*-AMSA [4'-(9-acridinoammino)metansulfon-*m*-anisidide] e con il suo conformero strutturale *o*-AMSA [4'-(9-acridinoammino)metansulfon-*o*-anisidide] (Figura 2.3). Entrambe le molecole sono agenti intercalanti che si legano al DNA con affinità diversa: quella dell'*o*-AMSA è circa 4 volte maggiore.^[41]

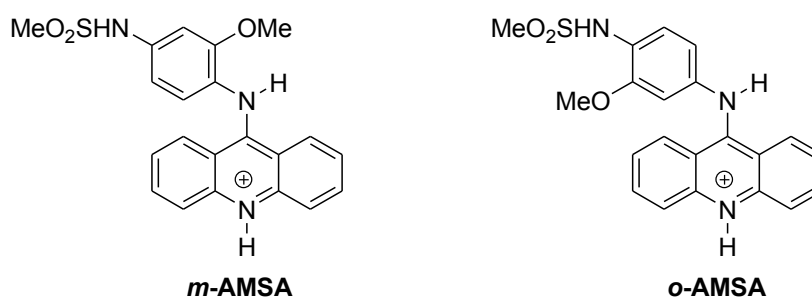


Figura 2.3

Nonostante ciò è proprio la *m*-AMSA a promuovere la rottura transitoria del doppio filamento grazie alla formazione del complesso ternario farmaco-DNA-topoisomerasi II svolgendo così con efficacia la sua azione chemioterapica. Oltre all'*m*-AMSA sono noti parecchi esempi di altri intercalanti che si legano alla topoisomerasi II nei loro complessi. Tra questi vi sono l'ascididemina, un alcaloide naturale pentaciclico aromatico, e i derivati del tetraidropirido[3,4-*a*]carbazolo-1,3-dione e del tetraidropirido[3,2-*b*]pirrolo[3,4-*g*]indolo-1,3-dione. La camptotecina, isolata da un albero cinese, è invece un potente inibitore della topoisomerasi I, enzima responsabile della rottura di una singola catena del DNA.

L'intercalazione è stata studiata negli ultimi anni anche dal punto di vista termodinamico in modo che, migliorando le proprietà strutturali del farmaco, sia possibile aumentare la sua affinità di legame con il DNA e la specificità della sequenza di base. L'energia libera complessiva del processo è data dalla somma delle energie libere dei vari stadi coinvolti nell'intercalazione.^[42] Si ha pertanto:

$$\Delta G_{\text{osservato}} = \Delta G_{\text{conf}} + \Delta G_{\text{t+r}} + \Delta G_{\text{idr}} + \Delta G_{\text{pe}} + \Delta G_{\text{mol}} \quad \text{eq. 1}$$

dove $\Delta G_{\text{osservato}}$ è l'energia di complessazione sperimentale, che misura la tendenza alla formazione del complesso farmaco-DNA ed è correlata alla corrispondente costante di associazione K_{ass} tramite l'equazione di Gibbs:

$$\Delta G^{\circ} \text{ osservato} = -RT \ln K_{\text{int}} \quad \text{eq. 2}$$

dove R è la costante universale dei gas e T è la temperatura assoluta in gradi Kelvin.

Ritornando all'equazione 1, ΔG_{conf} è l'energia libera derivante da cambiamenti conformazionali, sia nel DNA che nel farmaco, durante la formazione del complesso. $\Delta G_{\text{t+r}}$ è l'energia libera connessa con la riduzione dei gradi di libertà rotazionali e traslazionali, ΔG_{idr} è l'energia libera dovuta alle interazioni idrofobiche, ΔG_{pe} è l'energia libera del contributo polielettrolitico ed infine ΔG_{mol} rappresenta l'energia libera delle interazioni non covalenti tra il farmaco e le basi

del DNA.

L'energia libera delle interazioni idrofobiche (ΔG_{idr}) è relativa al processo di trasferimento del farmaco dalla soluzione acquosa all'interno idrofobico del DNA.

Per stimare questo contributo energetico si ripartisce l'agente intercalante in esame tra l'acqua ed un solvente apolare come l'1-ottanolo.^[43] Il ΔG_{idr} è correlato al coefficiente di ripartizione P mediante la seguente equazione:

$$\Delta G_{\text{idr}} = -RT \ln P \quad \text{eq. 3}$$

L'interazione di un farmaco carico positivamente con il DNA è spiegata dalla teoria polielettrolitica di Manning e Record secondo cui per neutralizzare le cariche negative del DNA, gli ioni di segno opposto, come l' Na^+ , si associano ai gruppi fosfato del DNA.^[44] L'intercalazione comporta la riduzione delle forze attrattive tra questi elementi ed aumenta la distanza tra i gruppi fosfato con conseguente rilascio dei controioni.^[45] È quest'ultimo processo che produce la forza trainante che favorisce il completamento della formazione del complesso farmaco-DNA. Nel modello proposto da Record, l'effettiva carica del ligande può essere così stimata:

$$-S = \frac{\delta \log K}{\delta \log [MX]} = -Z\Psi \quad \text{eq. 4}$$

dove $-S$ è la pendenza della retta ottenuta mettendo in un grafico i logaritmi delle costanti di associazione contro quelli della concentrazione del sale monovalente, Z è l'effettiva carica del ligande e Ψ è una costante che è uguale alla frazione di controioni associati con ciascun gruppo fosfato del DNA.

Studi successivi eseguiti da Friedman e Manning hanno permesso di determinare il valore di S che è pari a $-1,24$ per il legame di cationi monovalenti intercalanti con l'acido nucleico.^[46]

Nello studio termodinamico dell'intercalazione non bisogna prendere in considerazione solamente le variazioni dell'energia libera osservata ($\Delta G_{\text{osservata}}$) ma anche i cambiamenti dell'entropia (ΔS) e dell'entalpia (ΔH).

Il termine **entalpia** deriva dai cambiamenti di legame che hanno luogo con l'intercalazione del farmaco e che sono rappresentati da interazioni di Van der Waals, legami idrogeno ed interazioni ioniche. L'entalpia ha un valore negativo se si formano nuovi legami ed un valore positivo se questi invece si rompono.

Il termine **entropia** riflette i gradi di libertà del sistema (rotazionali e traslazionali), che si riducono in seguito alla formazione del complesso farmaco-DNA. Infatti, prima dell'intercalazione sia il cromoforo che l'acido nucleico possiedono ciascuno tre gradi di libertà rotazionali e tre gradi di libertà traslazionali; ma, con il verificarsi del processo di intercalazione è l'intero complesso che possiede adesso tre gradi di libertà rotazionale e tre di libertà traslazionale. Tale riduzione comporta una notevole penalizzazione del contributo entropico che si riflette su uno sfavorevole contributo dell'energia libera per la formazione del complesso.

Nell'equazione $\Delta G_{t+r} = T\Delta S_{t+r}$ l'entropia ha pertanto un netto valore negativo che Spolar e Record hanno stimato essere approssimativamente 50 ± 10 e.u. [47] Tuttavia, lo sfavorevole apporto entropico alla formazione del complesso di intercalazione è ampiamente compensato dalla favorevole energia di desolvatazione. [48]

Delle interazioni ligando-DNA è stata esaminata anche la cinetica. Considerando l'acridina si è visto come il processo dell'intercalazione abbia luogo in due stadi successivi. Nel primo si verifica il trasferimento del ligande, dal solvente, alle vicinanze del scanalatura minore o maggiore della doppia elica del DNA: l'interazione tra le due molecole è rapida e concentrazione dipendente. Il secondo stadio è più lento e avviene quando il cromoforo policiclico si inserisce nel sito di intercalazione. A questo profilo cinetico non si adatta l'actinomicina D per la quale la formazione del legame con il DNA è altamente complessa come pure la sua reazione di dissociazione. Il particolare comportamento di questa molecola è stato spiegato con la *shuffling hypothesis*, elaborata nel 1984 da Waring e Fox. [49] L'originale teoria richiede l'impiego di un analogo fotoreattivo

dell'actinomicina D per spiegare il meccanismo di “*shuffling*”.

L'analogo è la 7-azidoactinomicina D (Figura 2.4) che si lega al DNA in maniera identica al prototipo in assenza di luce. Lo studio prevede che questa molecola interagisca con un frammento di DNA di lunghezza e sequenza note e per intervalli di tempo definiti prima che abbia luogo la fotolisi. Questa convertirà poi la metà delle molecole di 7-azidoactinomicina D nel nitrene fotoreattivo che formerà, *in situ*, con il DNA un legame covalente irreversibile. I complessi ligande-DNA, frutto della fotolisi, sono successivamente identificati. La “*shuffling hypothesis*” ha dimostrato come inizialmente l'actinomicina D si legni in molti siti non-sequenza specifici del DNA e come poi si sposti lungo il doppio filamento per individuare sequenze specifiche, per le quali ha un'alta affinità, e legarsi ad esse.

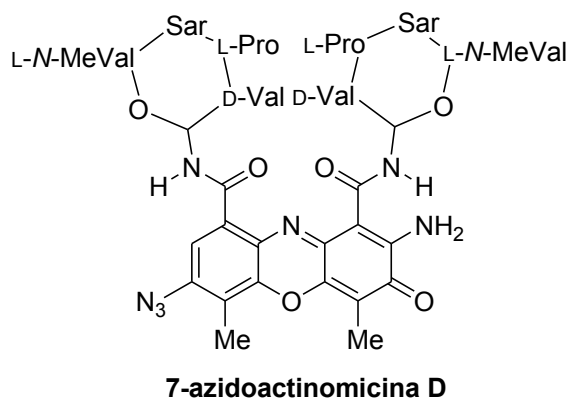


Figura 2.4

La maggior parte degli agenti intercalanti sinora noti si lega al DNA in maniera altamente specifica per quanto concerne la sequenza delle sue basi. È da quasi venti anni che si conducono studi per comprendere tale selettività e in che modo essa sia modulata dalle proprietà chimiche e/o fisiche del ligande. Muller e Crothers hanno studiato, ad esempio, le proprietà idrodinamiche, cinetiche e termodinamiche dell'interazione actinomicina D-DNA.^[50] La loro ricerca ha permesso di scoprire che il farmaco si inserisce tra la guanina e la citosina e che, inoltre, le catene laterali del pentapeptide ciclico formano legami idrogeno con il

gruppo 2-ammino della guanina tramite l'ossigeno carbonilico di un residuo di treonina.^[51] L'uso di svariati metodi biofisici ha successivamente confermato ciò.^[52]

La daunomicina e l'adriamicina sono altri due esempi di agenti antitumorali intercalanti che presentano selettività di legame per la sequenza di basi.

Legandosi al DNA ne inibiscono la replicazione e la trascrizione^[53] entrambe le molecole possiedono un cromoforo costituito da quattro anelli fusi ed un amminozucchero carico positivamente. La selettività deriva dalla formazione di specifici legami idrogeno tra il farmaco e le coppie di basi della doppia elica. Il gruppo ossidrilico in posizione 9 dell'antraciclina forma due legami idrogeno con l' N_2 e l' N_3 della guanina ed esso sembra essere davvero indispensabile per l'attività biologica della adriamicina e della daunomicina. È stato infatti dimostrato come i derivati di questi due composti privati dell'ossidrile in 9 siano inattivi. Il gruppo amminico N_3 dello zucchero della daunomicina e dell'adriamicina è capace di formare un legame idrogeno con l'ossigeno in posizione 2 della timina e della citosina.

Il chemioterapico AAC, cioè l'*N*-[2-(dimetilammino)etil]-9-amminoacridina-4-carbossammide e l'analogo DACA, *N*-[2-(dimetilammino)etil]-acridina-4-carbossammide, hanno le loro catene laterali che sporgono nella scanalatura maggiore del DNA piuttosto che in quella minore come si osserva nella daunomicina e nell'adriamicina.

La loro disposizione spaziale all'interno del doppio filamento è fortemente dipendente dallo stato di protonazione dell' N_{10} e dall'orientazione strutturale della catena laterale carbossammidica. Nell'AAC, il cui N_{10} è protonato, la catena carbossammidica è orientata in modo tale che è l'ossigeno carbonilico a formare un legame idrogeno con l' N_{10} . Invece, nel DACA, non protonato all' N_{10} , è l'idrogeno ammidico a legarsi, tramite un ponte idrogeno, con l' N_{10} . La variazione dell'energia libera di legame per l'AAC e la DACA è rispettivamente di $-7,6$ e $-6,6$ kcal/mol. Il valore più elevato del primo composto indica che il processo

d'intercalazione è più favorito per la supplementare carica positiva relativa all' N_{10} . Entrano in gioco pertanto effetti polielettrolitici. I valori negativi dell'entalpia per entrambe le molecole (ΔH dell'AAC = $-5,1$ kcal/mol e ΔH della DACA = $-6,7$ kcal/mol) dimostrano che il meccanismo termodinamico della formazione del complesso è guidato proprio da questa funzione di stato. Il legame dell'AAC con il DNA è in parte guidato pure dall'entropia che ha un valore di $+8,5$ e.u. Invece, il valore negativo della DACA ($\Delta S = -0,3$ e.u.) rivela un contributo sfavorevole dell'entropia, che deve essere compensato da quello dell'entalpia.^[54]

Le interazioni delle piccole molecole con gli acidi nucleici hanno suscitato un notevole interesse nel campo della progettazione dei farmaci antitumorali già negli ultimi trenta anni. Lo studio del loro legame con il DNA e la conseguente inibizione dei processi biochimici ha rivelato un meccanismo d'azione alquanto complesso che inoltre coinvolge molti altri componenti cellulari quali ad esempio le topoisomerasi I e II e la polimerasi del DNA. Progressi significativi sono stati conseguiti nella comprensione delle proprietà strutturali e dinamiche di molti complessi farmaco-DNA; tuttavia, sono necessari ulteriori studi per chiarire le orientazioni strutturali, la cinetica e la termodinamica di queste interazioni per lo sviluppo di una nuova classe di agenti intercalanti che potranno così permettere un controllo selettivo dell'espressione genica.

2.1.2 Chemioterapia e farmaci antineoplastici

L'efficacia terapeutica degli agenti intercalanti, come farmaci antitumorali, è legata alla loro capacità di inibire la replicazione e la trascrizione del DNA, processi essenziali per la vita delle cellule. Non potendo replicare il proprio acido nucleico, la cellula va infatti incontro a morte. Ed è proprio la morte cellulare l'obiettivo della chemioterapia; arrestare la crescita tumorale è possibile usando molecole terapeuticamente attive che alterano la proliferazione e la differenziazione delle cellule.

L'importanza di farmaci con tali proprietà è notevolmente aumentata negli anni visto che ormai il cancro è diventato la seconda causa di morte, dopo le malattie cardiovascolari. I tumori sono caratterizzati da un'anomala e incontrollata divisione delle cellule tissutali, processo che è conseguenza di un danno irreversibile subito dal DNA ad opera di vari cancerogeni. La divisione sia delle cellule normali che di quelle tumorali avviene mediante il ciclo cellulare, un insieme di cinque fasi che si susseguono l'un l'altra e che sono denominate rispettivamente:

fase G₀, G₁, S, G₂ e M.

La prima fase del ciclo, ovvero la G₀, è quella in cui la cellula non ha cominciato a dividersi. Essa è in uno stato di "riposo" che può durare poche ore come pure alcuni anni. Non appena dovrà iniziare a riprodursi si sposta verso la fase G₁, durante la quale ha luogo la sintesi degli enzimi necessari per la replicazione del DNA. La duplicazione del codice genetico si verifica immediatamente dopo, nella fase S, che può durare dalle 18 alle 20 ore. La G₂ è, invece, la fase che precede la vera e propria divisione cellulare, processo che ha luogo nella fase M, o della mitosi, e che permette di ottenere due nuove cellule aventi un corredo genetico del tutto analogo a quello della cellula madre (Figura 2.5).

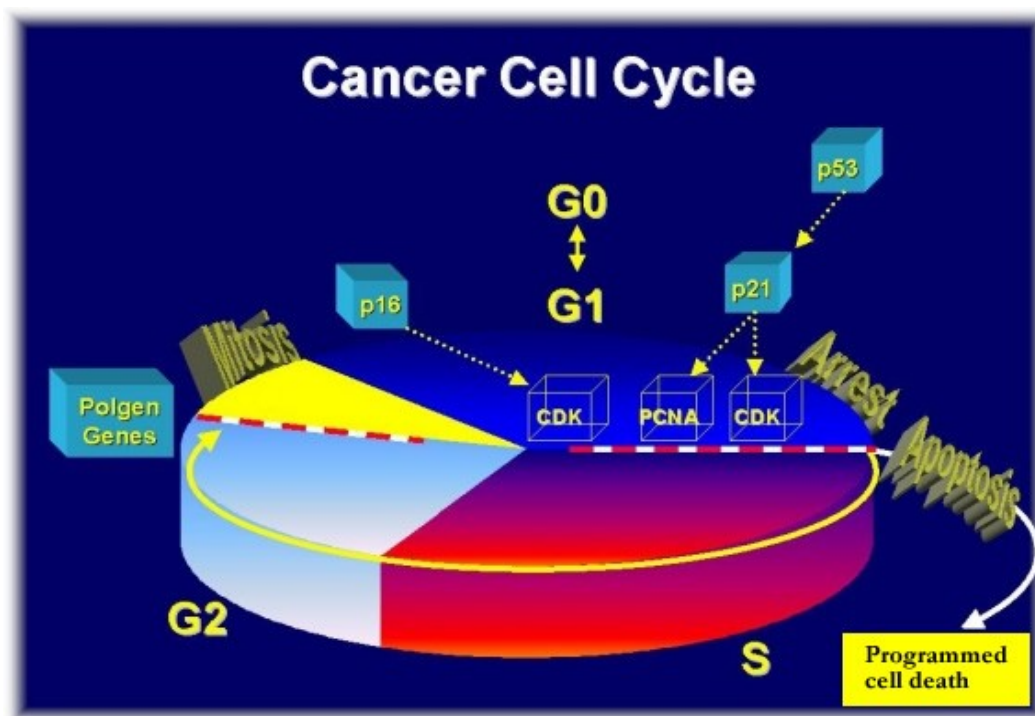


Figura 2.5

Conoscere questo ciclo è molto importante in oncologia visto che tutti i chemioterapici agiscono sulla divisione cellulare.

Alcuni di essi, gli “specifici del ciclo cellulare”, svolgono la loro azione solo sulle cellule che si riproducono. Altri, invece, definiti “non specifici”, operano sulle cellule a riposo ovvero su quelle che restano nella fase G0. I farmaci chemioterapici sono comunque più efficaci nell’uccidere le cellule che si dividono più rapidamente senza però essere contemporaneamente selettivi sulla natura di queste ultime. Essi cioè non sono capaci di differenziare le cellule cancerogene da quelle sane che saranno pertanto ugualmente danneggiate. Le cellule normali più frequentemente influenzate dalla chemioterapia sono quelle del sangue, della bocca, dello stomaco e quelle che costituiscono i follicoli dei capelli. L’azione indiscriminata dei farmaci su di esse è causa di bassi conteggi ematici, dolori alla bocca, nausea, diarrea e perdita dei capelli.

2.1.3 Natura degli antineoplastici e loro meccanismo d’azione

I farmaci chemioterapici sono suddivisi in classi in base al loro meccanismo d'azione, al loro bersaglio cellulare ed alla fase del ciclo replicativo che viene influenzato.

Agenti intercalanti

Sono molecole non fase-specifiche che operano direttamente sul DNA per impedire alle cellule tumorali di riprodursi. Questi farmaci sono usati per la cura di leucemie croniche, per il mieloma multiplo e per certi tumori al polmone, al seno ed alle ovaie.

Sono rappresentati da cisplatino, ciclofosfamide, ifosfamide, dacarbazina (DTIC).

Nitrosouree

Agiscono in modo simile agli agenti intercalanti. Più precisamente interferiscono con gli enzimi capaci di riparare il DNA. A differenza della maggior parte dei chemioterapici, le nitrosouree sono in grado di attraversare la barriera ematoencefalica trovando così applicazione nella cura di tumori cerebrali. Tra i principali ricordiamo la carmustina (BCNU) e la lomustina (CCNU).

Antimetaboliti

Gli antimetaboliti agiscono come analoghi di substrati fisiologici vitali. Quando le cellule li introducono nel loro metabolismo, diventano incapaci di dividersi poiché gli antimetaboliti interferiscono con la sintesi del DNA e dell'RNA. Questi agenti operano nella fase S e sono utilizzati per il trattamento di leucemie croniche e di tumori polmonari, ovarici e del tratto gastro-intestinale.

Gli esempi comprendono il 5-fluorouracile, il metotrexato, la citarabina (o Ara-C, analogo della pirimidina) e la 6-mercaptapurina (analogo della purina).

Antibiotici antitumorali

Sono prodotti naturali provenienti da ceppi di *Streptomyces*. Bloccano l'attività degli enzimi che operano sul DNA oppure fermano la mitosi o si intercalano nella

doppia elica dell'acido nucleico. Operano in tutte le fasi del ciclo cellulare e ciò consente di usarli per una grande varietà di tumori.

Alcuni esempi di tali antibiotici sono: la dactinomicina, la daunorubicina, la doxorubicina, l'idarubicina ed il mitoxantrone.

Inibitori mitotici

Sono alcaloidi di origine vegetale in grado di arrestare la mitosi o inibire gli enzimi che producono proteine necessarie per la riproduzione cellulare. Essi operano pertanto durante la fase M.

Sono rappresentati dagli alcaloidi della vinca (vincristina, vinblastina, vinorelbina), dagli analoghi della camptotecina, dal plactaxel e dal docetaxel.

Ormoni corticosteroidi

Gli steroidi, ormoni naturali, ed i farmaci ormone-simili sono utili nel trattamento di alcuni tipi di tumore (linfoma, leucemie, mieloma multiplo) e per la cura di altre malattie. Alcuni esempi sono il prednisone ed il desametasone.

Ormoni sessuali

Gli ormoni sessuali ed i farmaci ormone-simili alterano la produzione di ormoni femminili o maschili. Sono usati per rallentare la crescita dei tumori alla prostata ed all'endometrio, che normalmente crescono in risposta ai livelli di ormoni nel corpo.

Sono rappresentati da antiestrogeni (tamoxifene, fulvestrant), progestinici (megestrol acetato), antiandrogeni (bicalutamide, flutamide) ed agonisti dell'LHRH (leuprolide).

Altri

Altri farmaci chemioterapici agiscono in modo diverso e non si adattano a nessuna delle categorie finora descritte.

2.2 scopo del lavoro

Nella seconda parte del lavoro di tesi la nostra attenzione è stata rivolta alla sintesi di idrocarburi policiclici aromatici direttamente legati a sistemi *ossazolo[3,4-*a*]pirazin-6(3H)-oni*, sfruttando le potenzialità offerte dalle metodologie delle reazioni domino promosse dal palladio(II).

L'interesse verso questa serie di composti è dettato dalla capacità intrinseca che possiede l'idrocarburo policiclico aromatico (IPA) di comportarsi da intercalante del DNA e dalla possibilità che il sistema ossazolpirazinico generi legami a idrogeno con le nucleobasi del DNA.

Il nostro disegno è supportato dalla considerazione di due requisiti principali:

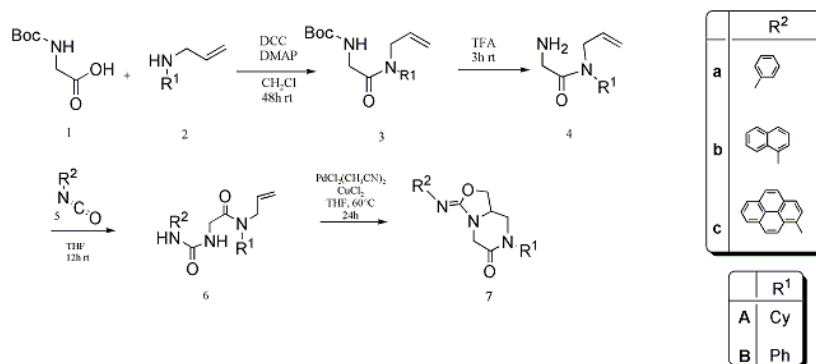
- 1) per realizzare un'intercalazione efficace è desiderabile avere una molecola che possiede sistemi poliaromatici fusi formati da 3–6 anelli;
- 2) per effettuare efficaci correlazioni struttura attività all'interno di una famiglia di molecole intercalanti, sarebbe conveniente disporre di funzionalizzazioni regioselettive del nucleo policiclico.

L'anello ossazolpirazinico garantisce la seconda circostanza grazie alla possibilità di interessanti manipolazioni sintetiche; inoltre, la possibilità di applicare la metodologia delle reazioni domino promosse da Pd(II) potrebbe contribuire alla formazione di diverse tipologie di bicicli, che condurrebbero ad una migliore interazione con i siti del DNA mediante formazione di favorevoli interazioni deboli.

Il nucleo ossazolo[3,4-*a*]pirazin-6(3H)-onico, coniuga le caratteristiche chimiche del Metotrexato e della Daunorubicina, farmaci usati nel trattamento di alcune neoplasie, in grado di ridurre e/o modulare l'overespressione del Tfr nella progressione dei tumori tiroidei. A tale scopo sono stati studiati gli effetti delle suddette molecole sull'attivazione del pathway mediato dal Tfr1 su colture di linee cellulari di tumore tiroideo umano a diversi gradi di malignità ed invasività (tumore, follicolare, papillare ed anaplastico), non trattate e trattate con le molecole precedentemente sintetizzate.

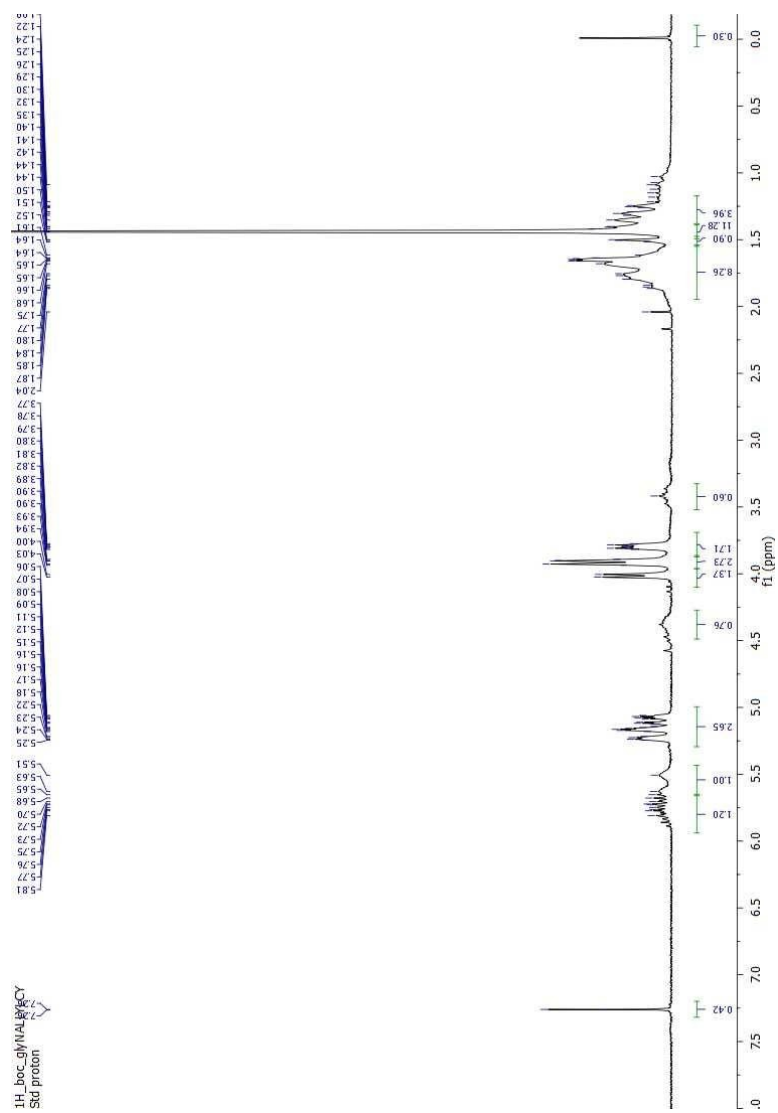
2.3 risultati e discussione

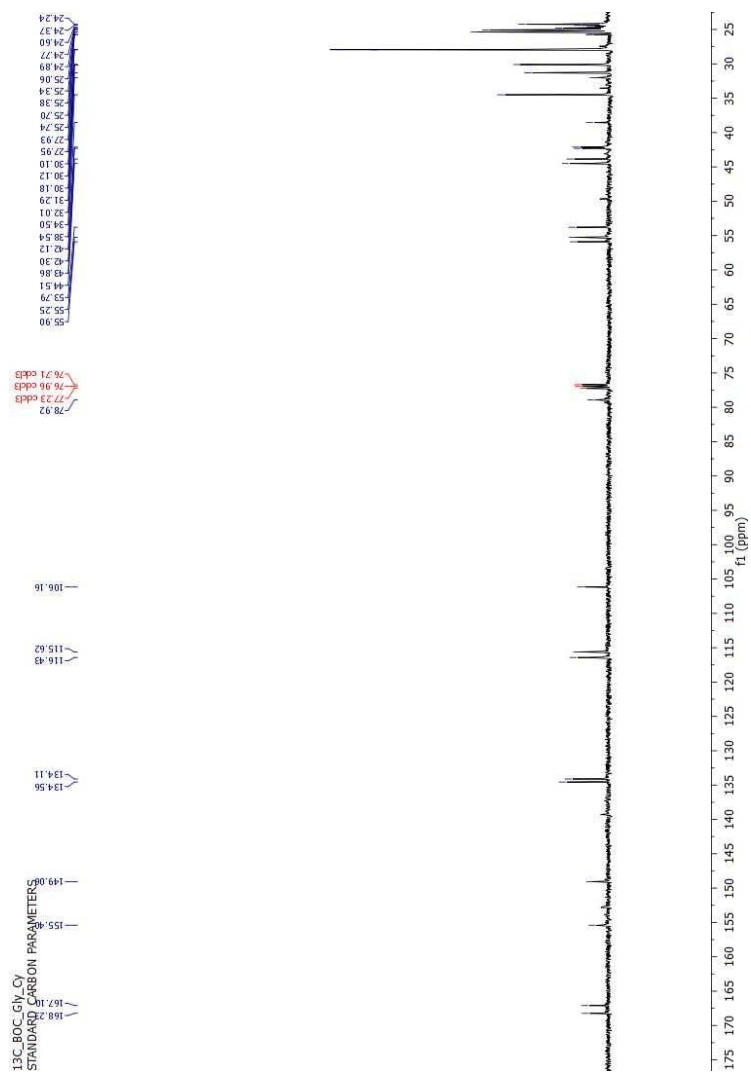
I composti ossazolo [3,4-a] pirazinici **7** sono stati preparati come mostrato nello schema 5.

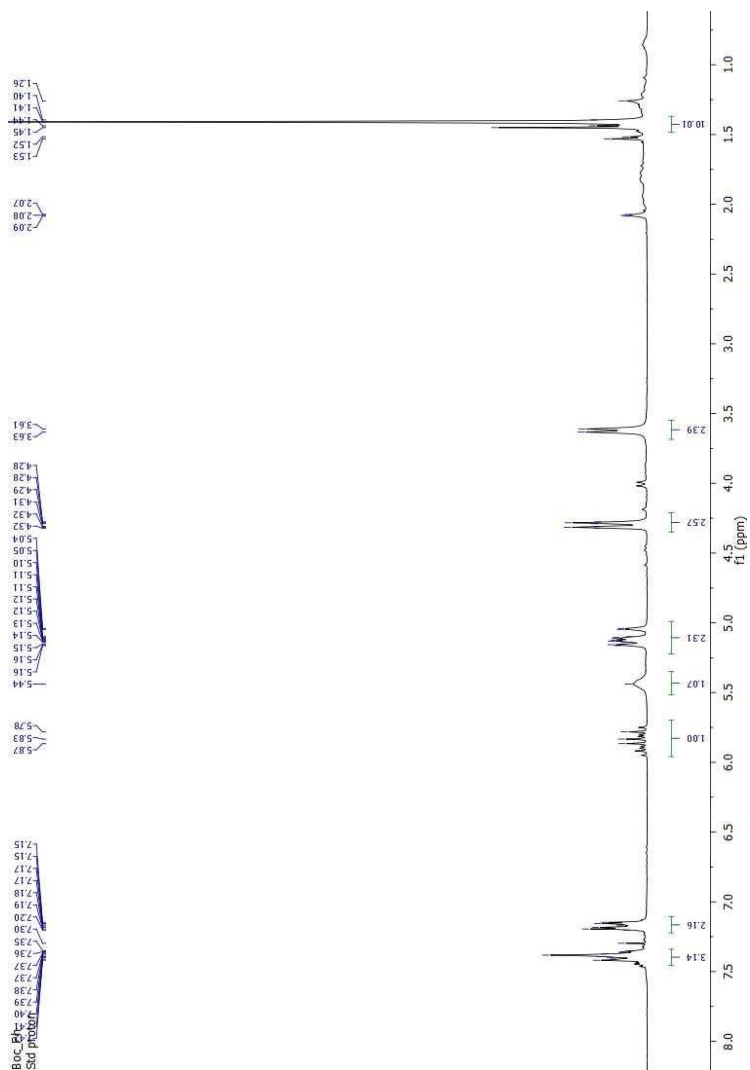


Schema 5

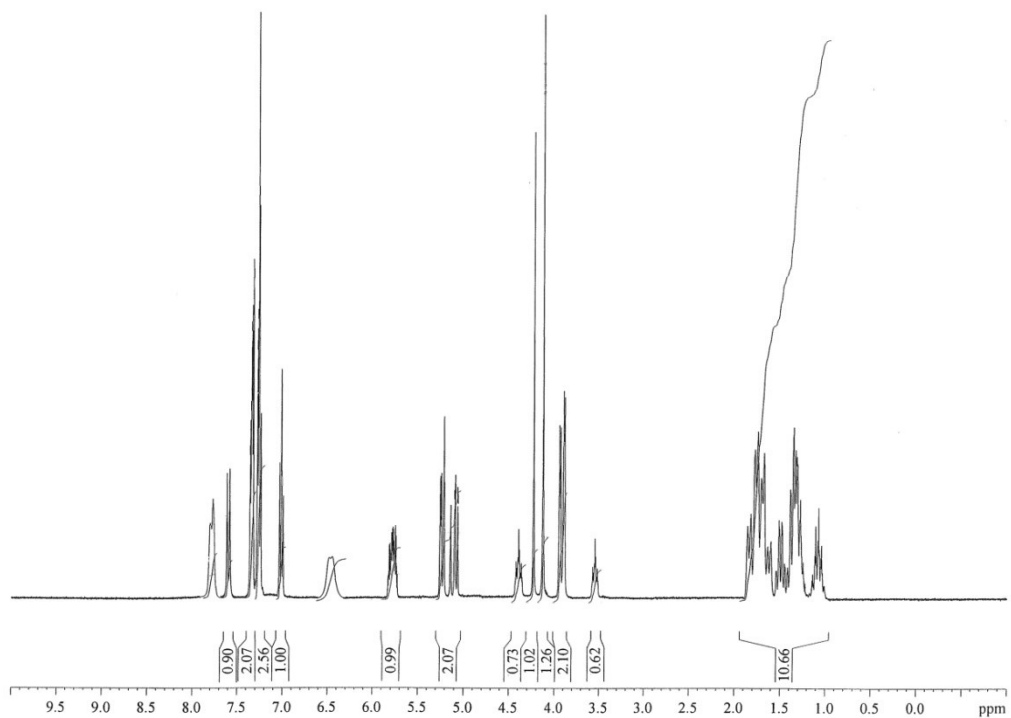
In particolare, le ammidi **3** sono state ottenute facendo reagire la glicina boccata **1** con le corrispondenti allilammine *N*-sostituite **2 A-B**, con rese di 85-87%. Tutte le ammidi sono state caratterizzate in base ai loro dati spettroscopici. Gli spettri ^1H NMR mostrano per la serie **A**, oltre ai segnali alifatici del cicloesile, tre multipletti nell'intervallo di 5.68-5.89 ppm e gli altri due rispettivamente a 5.41 ppm e 5.08-5.23 ppm, dovuti ai protoni dell'alchene ed un doppietto a 4.05 ppm, relativo al protone metilenico accanto al carbonile dell'ammido. Per la serie **B**, rileviamo, oltre ai segnali aromatici del fenile, i multipletti nell'intervallo di 5.91-5.78 ppm e a 5.15-5.10 ppm. Negli spettri ^{13}C NMR è diagnostico, in tutti i casi, il segnale a 168.27 ppm inerente il carbonile ammidico.

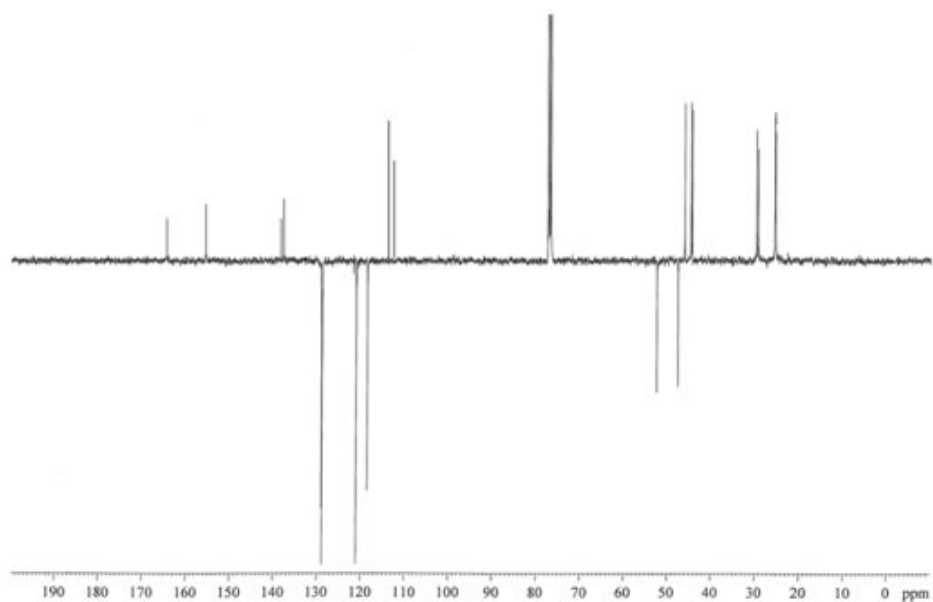
Spettro ^1H NMR del composto **3A**

Spettro ^{13}C NMR del composto **3A**

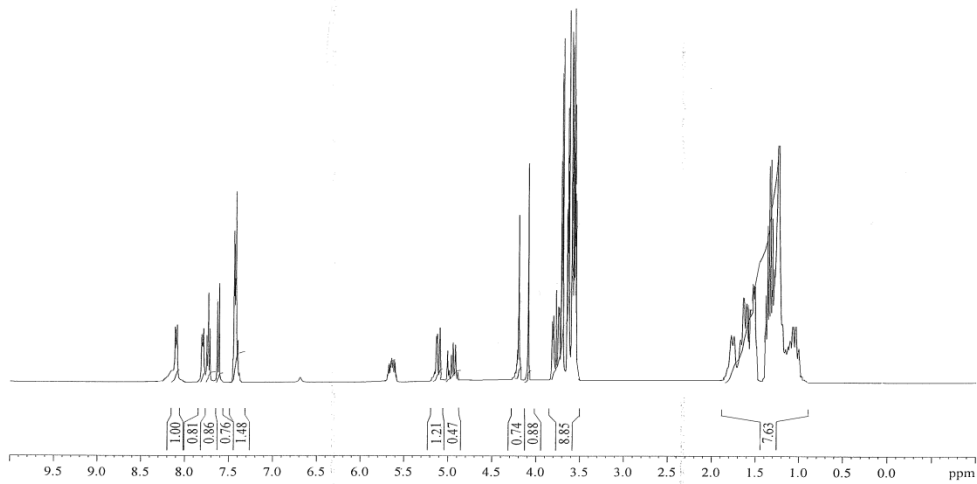
Spettro ^1H NMR del composto **3B**

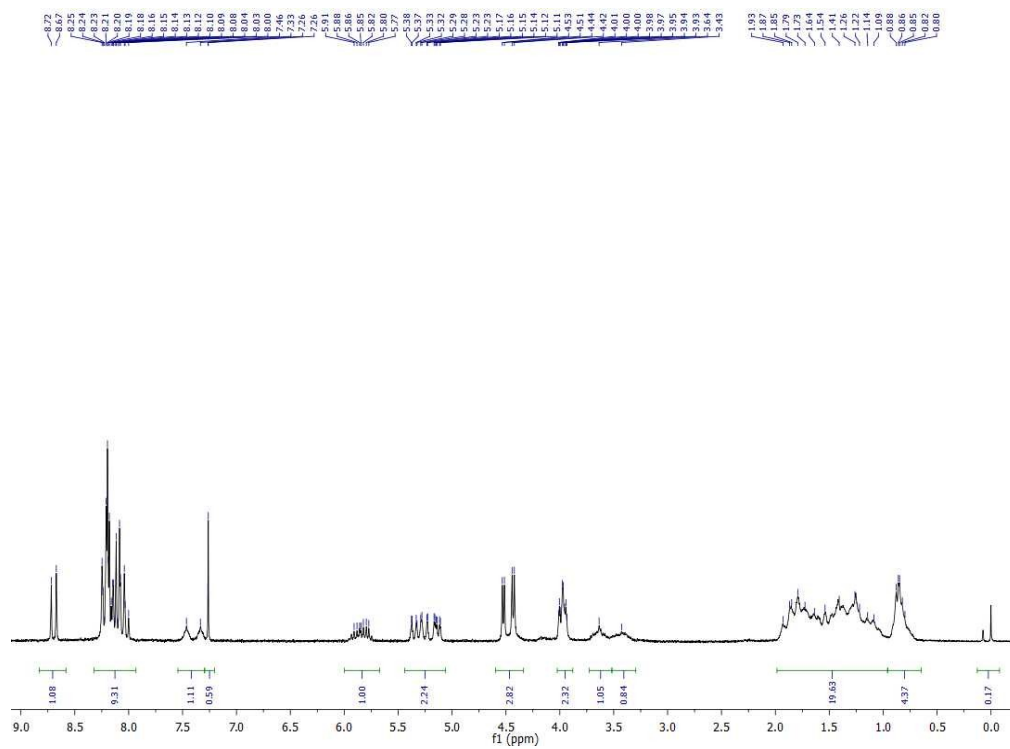
Successivamente, le ammidi **3** sono state fatte reagire con acido trifluoroacetico (1.2 eq) in diclorometano, in modo da ottenere gli *N*-allilammino derivati **4** che senza ulteriore purificazione sono stati fatti reagire con gli isocianati **5** (1 eq), fornendo le alcheniluree **6** in buone rese. Tutte le uree sono state caratterizzate in base ai loro dati spettroscopici. Gli spettri ^1H NMR mostrano per l'urea **6aA** un multipletto nell'intervallo di 5.72-5.87 ppm e un multipletto a 5.06-5.26 ppm, dovuti ai protoni H3a/H3b dell'alchene ed un singoletto a 4.23 ppm, relativo al protone metilenico *N*-ureidico. Nello spettro ^{13}C NMR è diagnostico il segnale inerente il carbonile ureidico a 155.5 ppm; per l'intermedio **6bA** un multipletto nell'intervallo di 5.56-5.72 ppm e un altro a 4.98-5.16 ppm dovuto ai protoni alchenilici, mentre il singoletto a 4.11 ppm è relativo al protone metilenico *N*-ureidico. Nello spettro ^{13}C NMR il segnale del carbonile ureidico è a 157.0 ppm; la molecola **6cA** mostra un multipletto nell'intervallo di 5.72-5.90 ppm e un altro a 5.10-5.37 ppm, dovuti ai protoni dell'allile, ed un doppietto a 4.53 ppm, relativo al protone metilenico dell'urea; Per la serie **B**, il substrato **6cB** mostra oltre ai segnali aromatici del fenile, il multipletto caratteristico dell'alchene nell'intervallo di 5.61-5.74 ppm. Il ^{13}C NMR mostra il segnale carbonilico a 156.94 ppm.

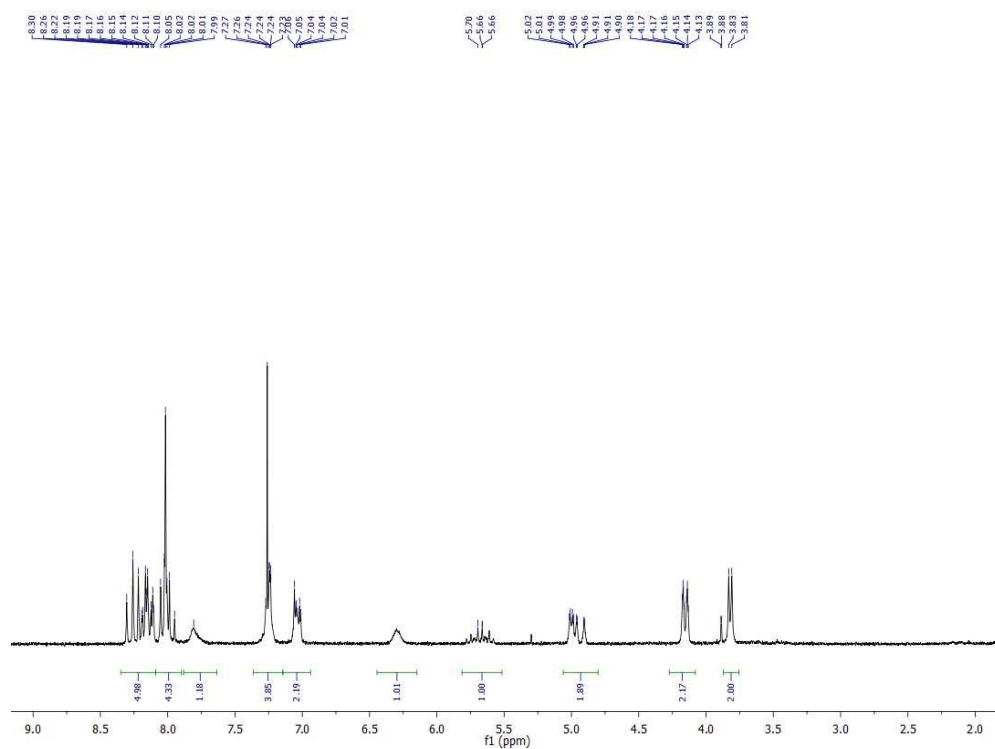
Spettro ^1H NMR del composto **6aA**

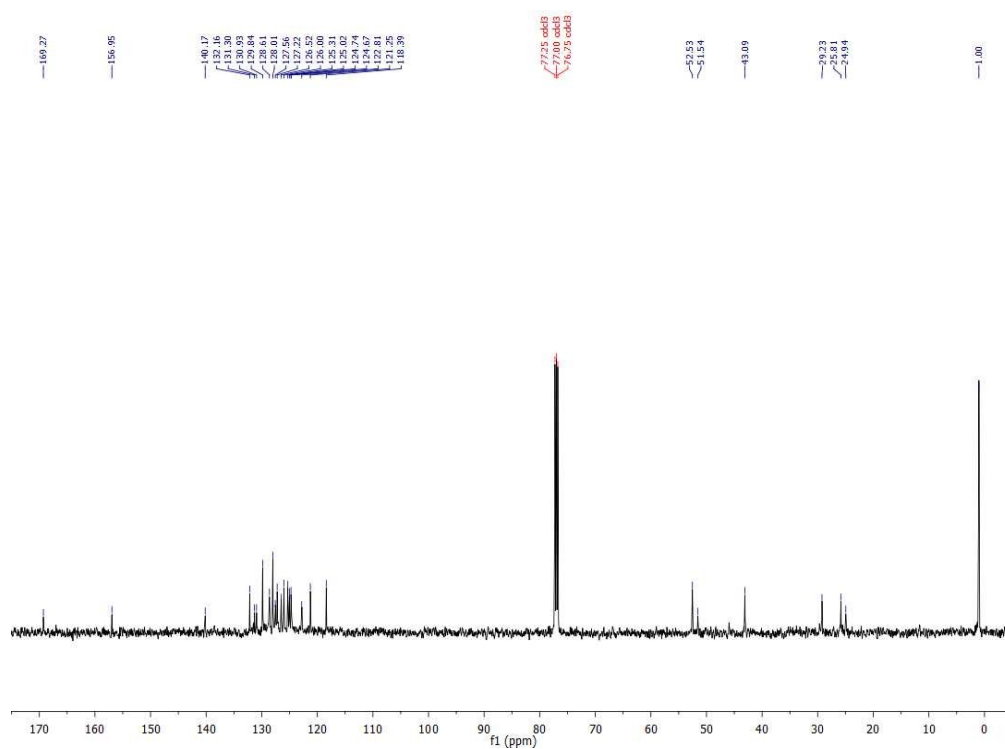
Spettro ^{13}C NMR del composto **6aA**

Spettro ^1H NMR del composto **6bA**

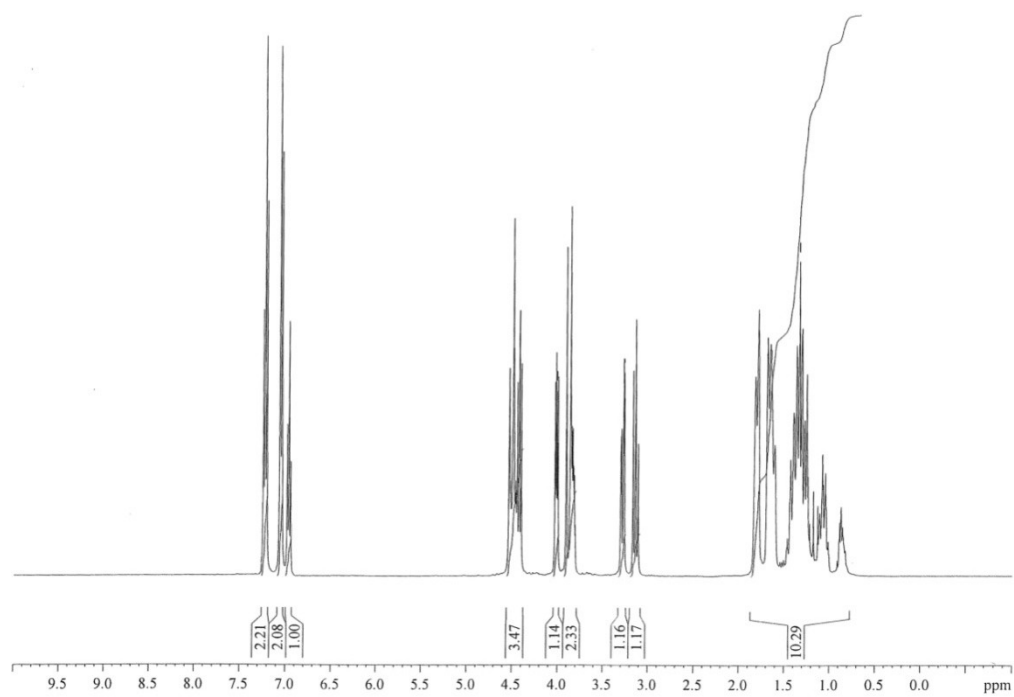


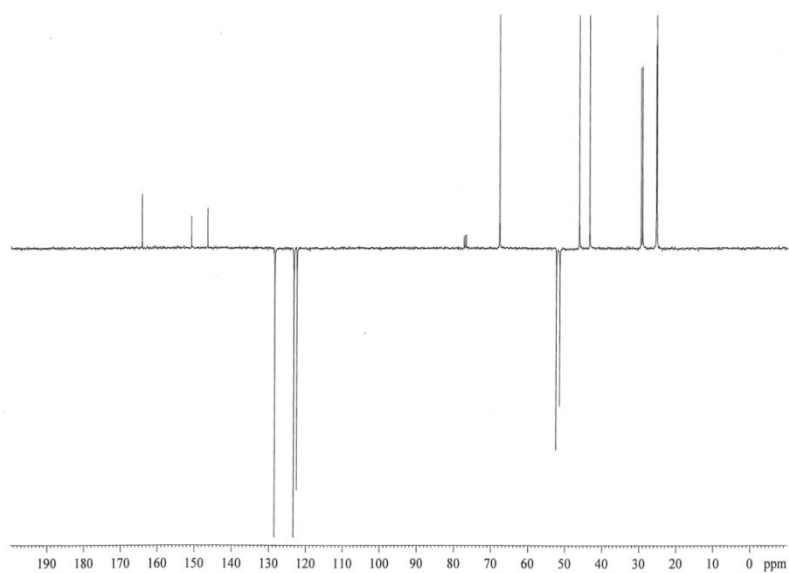
Spettro ^1H NMR del composto **6cA**

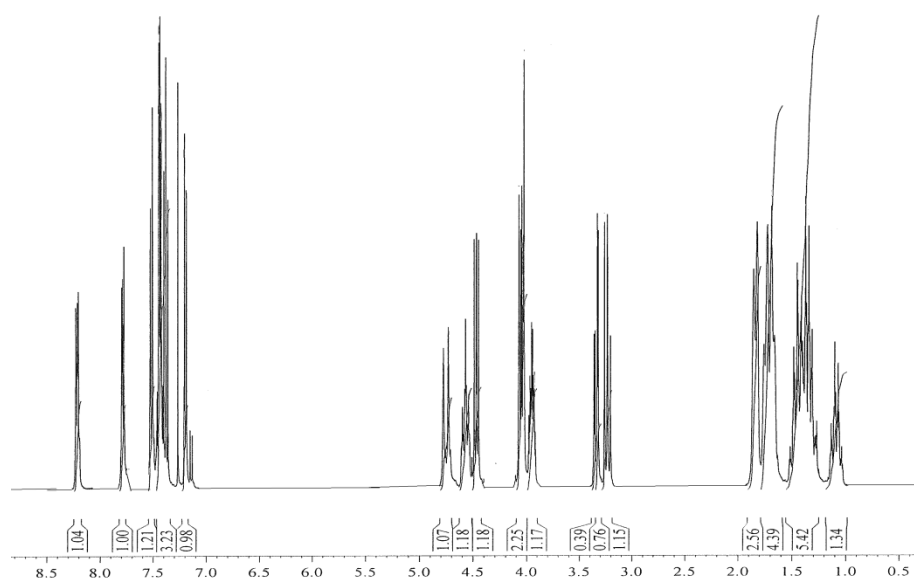
Spettro ^1H NMR del composto **6cB**

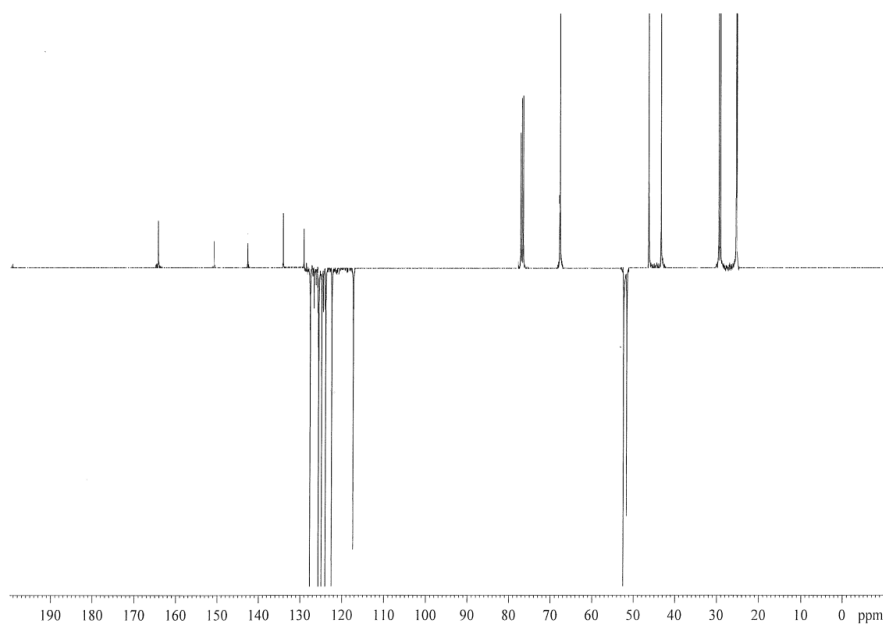
Spettro ^{13}C NMR del composto **6cB**

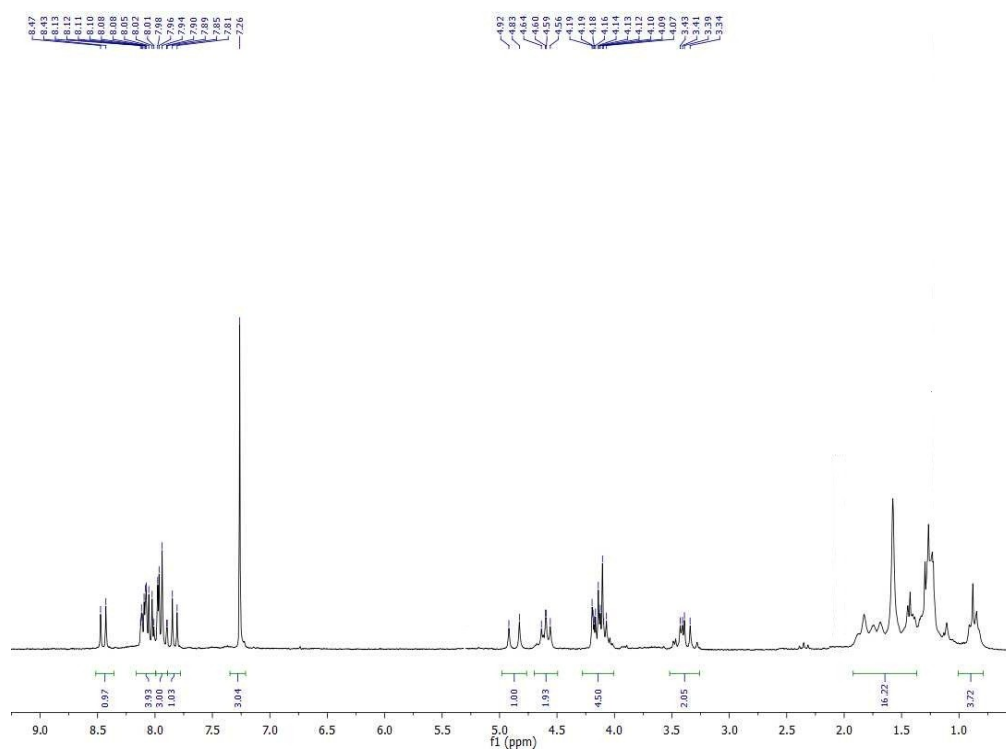
Successivamente, le ossazolpirazine **7** sono state ottenute facendo reagire le uree **6** in presenza della coppia bimetallica $\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2/\text{CuCl}_2$, con rese che vanno dal 65-85%. Tutte le pirazine sono state caratterizzate in base ai loro dati spettroscopici. Gli spettri ^1H NMR mostrano per tutte le molecole della serie **A** i segnali alifatici del cicloesile tra 1.25-1.82 ppm, l'assenza dei segnali dell'allile e la comparsa dei segnali relativi ai protoni del biciclo, ossia il doppio doppietto a 3.15 ppm, il doppietto a 4.53 ppm, i due doppi doppietti rispettivamente a 4.02 ppm e 4.43 ppm. Per la serie **B**, rileviamo, oltre ai segnali aromatici del fenile e del pirenile, il doppietto a 5.04 ppm.

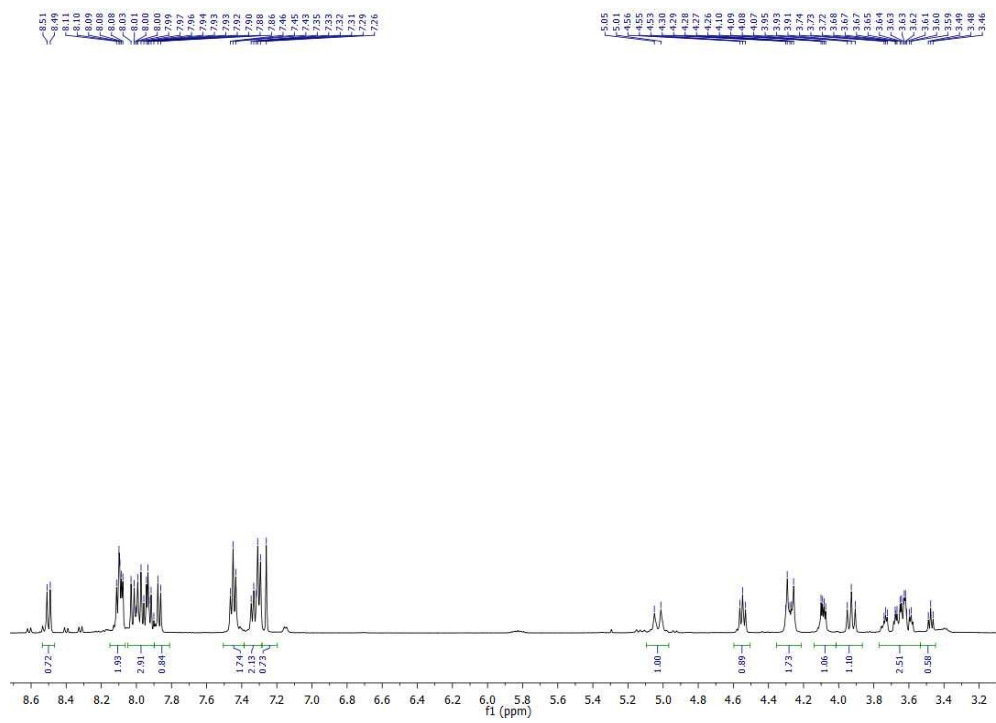
Spettro ^1H NMR del composto **7aA**

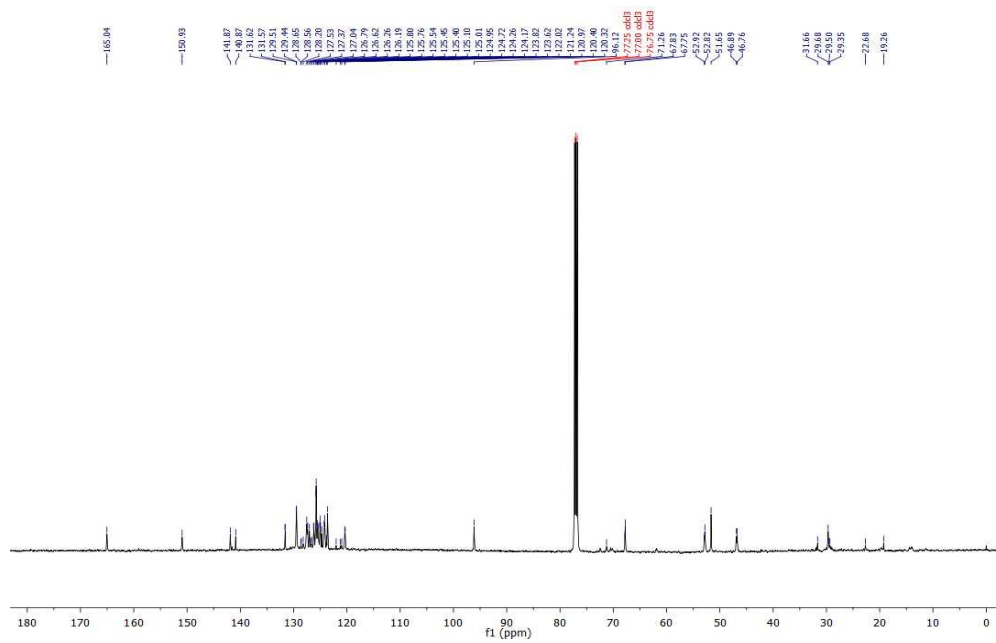
Spettro ^{13}C NMR del composto **7aA**

Spettro ^1H NMR del composto **7bA**

Spettro ^{13}C NMR del composto **7bA**

Spettro ^1H NMR del composto **7cA**

Spettro ^1H NMR del composto **7cB**

Spettro ^{13}C NMR del composto **7cB**

2.3.1 Aspetti meccanicistici

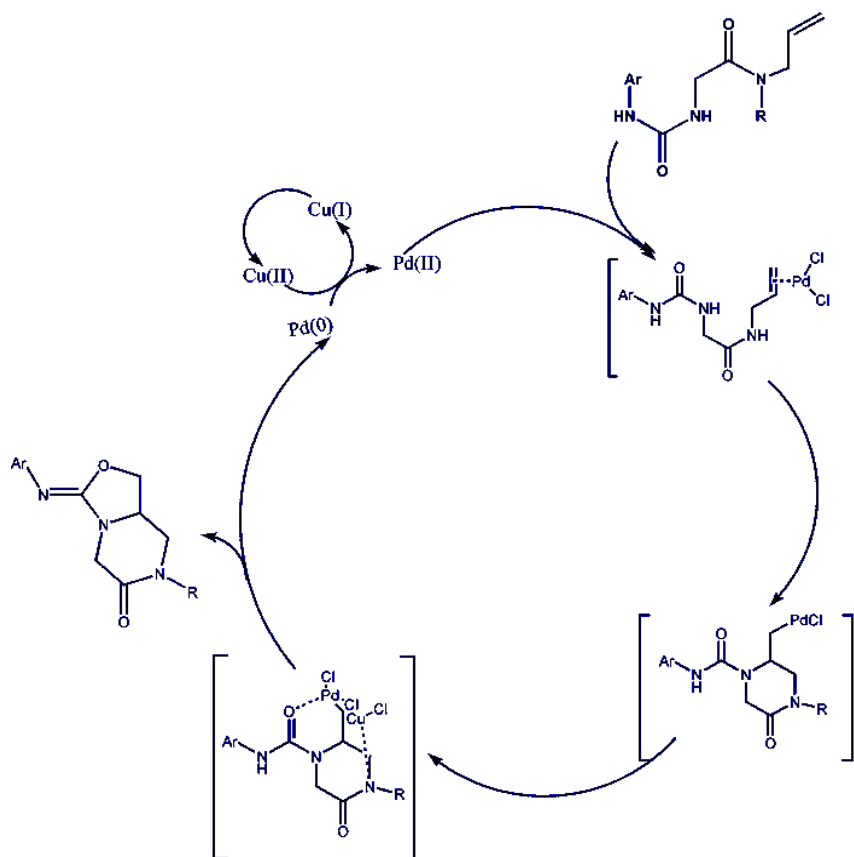


Figura 2.6

Una volta ottimizzata la sintesi, siamo passati ad ipotizzare un possibile decorso meccanicistico: dopo la coordinazione del metallo all'olefina, il complesso π evolve nel complesso σ di alchil-palladio, per attacco nucleofilo ad opera dell'azoto. Questo complesso può evolvere in un intermedio stabilizzato dalla coppia bimetallica palladio-rame, che successivamente subisce un secondo attacco nucleofilo ad opera dell'ossigeno carbonilico ed evolve nel prodotto finale di amminoossigenazione.

2.3.2 Parte biologica

2.3.2.1 Materiali

Le linee cellulari di tumore tiroideo umano follicolare (FTC-133) ed anaplastico (8305C) sono state fornite dalla Cell Bank Interlab Cell Line Collection (Genova, Italia). I *Medium* di coltura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, GIBCO), Ham's F12 (GIBCO), Minimum Essential Medium (MEM), gli aminoacidi non essenziali, il Normal Goat Serum (NGS, GIBCO), la trispina/EDTA allo 0.05%, la glutammina, la streptomicina, la penicillina, il Siero Fetale Bovino (FBS, GIBCO) e l'anticorpo monoclonale di topo contro il Tfr1 sono stati forniti dalla Ditta Invitrogen (Milano, Italia). L'aprotinina, la leupeptina, la pepstatina, il dimetilsolfossido tetrazolium bromide (DMSO) ed altri reagenti per chimica analitica sono stati forniti dalla Ditta Sigma (Milano, Italia). L'anticorpo policlonale secondario anti-IgG contro il topo coniugato con rodamina (TRITC) sono stati forniti dalla Ditta Chemicon (Milano, Italia). Gli anticorpi monoclonali di topo contro la caspasi-3 è stato fornito dalla Ditta Bectno-Dickinson (Milano, Italia). L'Apoalert DNA fragmentation assay kit è stato fornito dalla Ditta Clontech, Italia.

Culture cellulari

Le colture di linee umane FTC-133 e 8305C sono state sospese sono state impiantate ad una densità di $0,5 \times 10^6$ in piastre di chamber-slides (NUNC) oppure ad una densità di 2×10^6 in fiasche Falcon da 75 cm^2 in "Medium basale" costituito per le linee cellulari FTC-133 da DMEM + Ham's F12 (1:1) contenente FBS al 10%, glutammina 2 mM, penicillina (50U/ml) e streptomicina (50 µg/ml), e da MEM contenente FBS al 10%, glutammina 2 mM, aminoacidi non essenziali 1%, penicillina (50U/ml) e streptomicina (50 µg/ml). Le colture cellulari sono state mantenute a 37°C in ambiente di aria umidificata e CO₂ (95%-5%). Il "*Medium di coltura*" è stato cambiato ogni 3 giorni. Quando le cellule, dopo circa una settimana, raggiungevano l'80-90% di confluenza venivano sottocoltivate in un rapporto 1:3-1:4.

Trattamento delle colture

Alcune colture di linee cellulari FTC-133 e 8305C sono state trattate con diverse concentrazioni di **7aA**, **7bA**, **7cA**, **7cB**, **PyrAld** (pirene carbossialdeide) (5, 10, 25, 50, 150 e 200 μ M) e mantenute a 37°C in ambiente di aria umidificata e CO₂ (95%-5%) per 12, 24, e 48 ore.

Test MTT

Per valutare la concentrazione delle suddette molecole e stabilire il tempo di esposizione delle linee cellulari è stata valutata la vitalità cellulare, mediante il Test MTT. L'analisi è stata condotta secondo il metodo descritto da Mosmann (1983); 2×10^6 cellule, prima della fine del trattamento, sono state poste in presenza di 20 μ l di 0,5% di MTT in PBS. Dopo l'incubazione con questo reagente, il sovrantante è stato rimosso e sostituito con 100 μ l di DMSO. La densità ottica di ogni campione è stata misurata ad uno lettore a micropiastre a λ di 570 nm.

Imminofluorescenza per valutare l'espressione del TfR1 ed il clivaggio della caspasi-3

Le colture cellulari al 90% di confluenza sono state fissate in paraformaldeide al 4 % (w/v), disciolta in PBS, incubate per 1 h con NGS all'1 % a 37°C e, successivamente, incubate per 1 h a 37°C con un anticorpo monoclonale di topo contro il TfR, diluito 1:100 oppure con quello monoclonale di topo contro la caspasi-3, diluito 1:100. Dopo 3 lavaggi con PBS, le cellule sono state nuovamente incubate per 1 h a 37°C con un anticorpo policlonale secondario anti-IgG contro il topo coniugato con rodamina (diluito 1:200). Dopo 3 lavaggi con PBS, le colture cellulari sono state montate in glicerolo al 90 % ed esaminate al microscopio a fluorescenza Leika (Germania). L'espressione e la localizzazione del TfR è stata anche valutata mediante il Microscopio a Scansione Laser Confocale Zeiss (Germania) (Campisi, et al., 2003).

Valutazione della frammentazione del DNA mediante TUNEL Test

Le colture non trattate e trattate con le suddette molecole per 24 h sono state fissate e permeabilizzate con formaldeide/PBS al 4% contenente Triton X-100 allo 0,2% ad una temperatura di 4°C per 25 minuti, lavate 3 volte con PBS sterile e conservate per due settimane a -20°C in etanolo al 70%. Dopo 15 giorni i vetrini, dopo essere stati sottoposti a tutti i passaggi riportati sul manuale di istruzioni fornito dalla Ditta, sono stati montati con glicerolo all'80% e visualizzati al microscopio a fluorescenza (Leika, Germania). Le cellule apoptotiche che esibivano una forte fluorescenza nucleare verde sono state visualizzate utilizzando un filtro standard di fluoresceina a $\lambda=520 \pm 20$ nm, mentre tutte quelle colorate con propidio ioduro che esibivano una forte fluorescenza rossa citoplasmatica sono state visualizzate a $\lambda >620$ nm.

2.3.2.1 Risultati biologici

Nella figura 2.7 sono riportate le colture di linee cellulari FTC-133 ed 8305C osservate mediante microscopio a contrasto di fase. Come si può osservare le FTC-133 sono cellule piatte con morfologia di tipo policlonale che crescono in monostrato (Fig.2.7 A) mentre le 8305C sono più larghe e hanno una forma più allungata (Fig. 2.7 B)

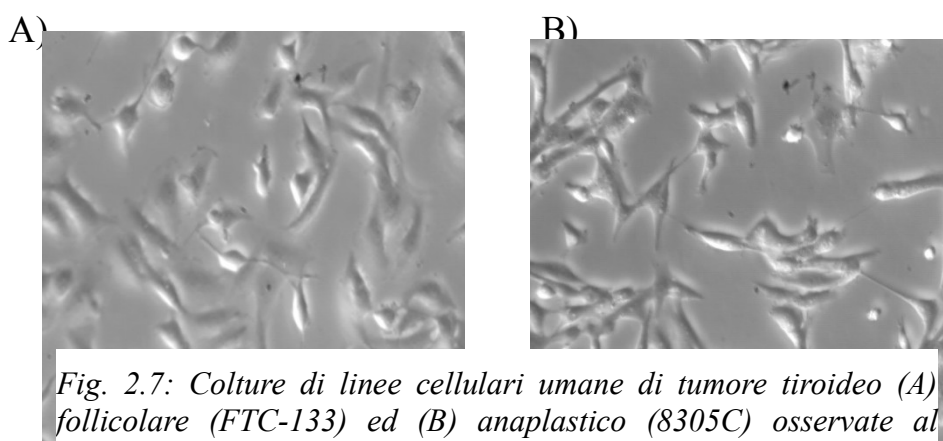


Fig. 2.7: Colture di linee cellulari umane di tumore tiroideo (A) follicolare (FTC-133) ed (B) anaplastico (8305C) osservate al microscopio a contrasto di fase.

Nella figura 2.8 sono riportati i risultati ottenuti su singola cellula mediante tecniche di immunocitochimica ed analizzate al CLSM. I risultati ottenuti hanno evidenziato che il TfR1 era espresso in entrambe le linee cellulari. Inoltre, abbiamo osservato che sia nelle colture di linee cellulari FTC-133, che in quelle 8305C, il recettore era localizzato a livello della membrana plasmatica, nel citosol, nei mitocondri e nei nucleoli di entrambi i tipi cellulari. Abbiamo anche notato che nelle linee cellulari 8305C era maggiormente espresso rispetto alle FTC-133, ed era anche localizzato a livello del compartimento nucleare.

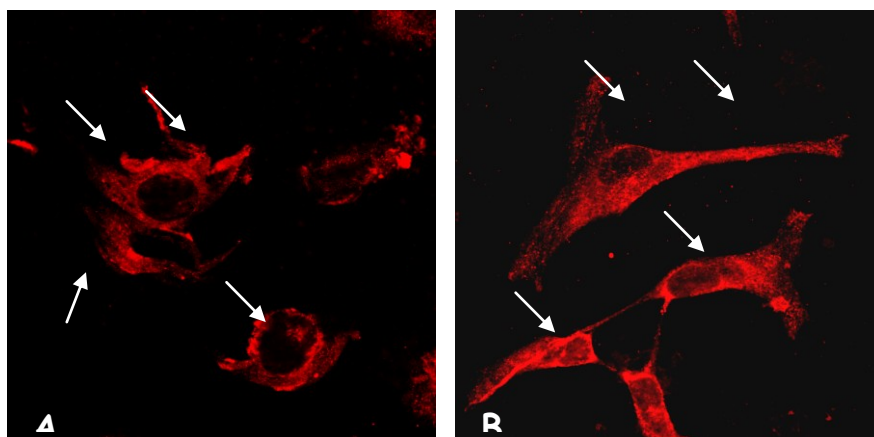


Figura 2.8: Espressione e localizzazione del Tfr1 in linee cellulari di tumore tiroideo umano follicolare (A, FTC-133) e anaplastico (B, 8305C) mediante analisi al CLSM. I dati sono stati ottenuti esaminando 4 campi/vetrino di quattro esperimenti. (Bars: 40 μ m).

Per valutare la concentrazione delle diverse molecole da noi sintetizzate e stabilire il tempo di esposizione delle linee cellulari di tumore follicolare ed anaplastico tiroideo umano, è stata valutata la vitalità cellulare, mediante il Test MTT. Abbiamo osservato che la concentrazione ottimale in grado di ridurre la vitalità cellulare era 150 μ g/ml per 24 h.

Nelle figure 2.9, 2.10 e 2.11 è riportato l'effetto delle molecole da noi testate sulle linee cellulari di tumore follicolare ed anaplastico tiroideo sull'espressione del Tfr. Come è possibile notare tutte le molecole ad eccezione del PyrAld erano in grado di ridurre la positività per il recettore in entrambe le linee cellulari ed abbiamo altresì evidenziato che l'effetto era maggiormente evidente nelle colture di linee cellulari di tumore tiroideo follicolare umano, rispetto a quello osservato nelle linee di tumore tiroideo anaplastico. In particolare abbiamo rilevato che le molecole che erano in grado di ridurre progressivamente la positività al Tfr erano progressivamente erano la 7cA, 7aA, 7cB e 7bA (figura 2.9). In parallelo abbiamo osservato che queste ultime attivano il clivaggio della caspasi-3 e inducevano frammentazione del DNA valutata mediante il TUNEL test (Figura 2.10).

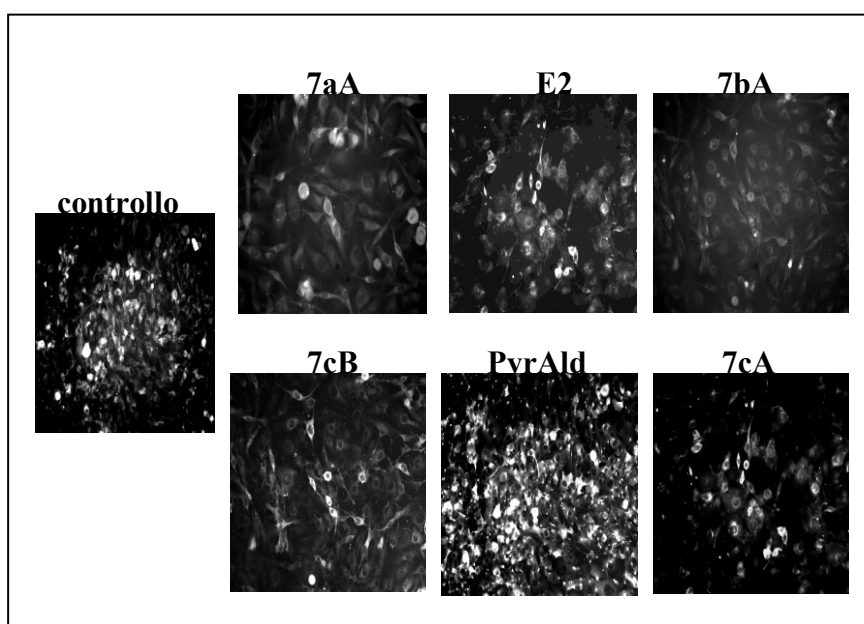


Figura 2.9 : Effetto delle diverse molecole sull'espressione del Tfr1 in linee cellulari di tumore tiroideo umano follicolare (FTC-133) valutata al microscopio a fluorescenza Leika (Germania). I dati sono stati ottenuti esaminando 4 campi/vetrino di quattro esperimenti (Bars: 20 μ m).

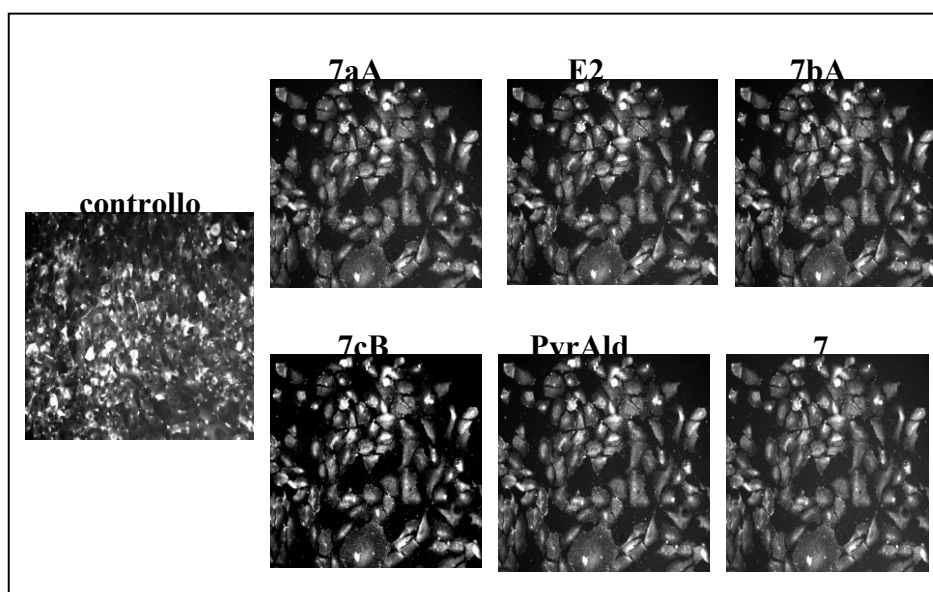


Figura 2.10: Effetto delle diverse molecole sull'espressione del TFR1 in linee cellulari di tumore tiroideo umano anaplastico (8305C) valutata al microscopio a fluorescenza Leika (Germania). I dati sono stati ottenuti esaminando 4 campi/vevtrino di quattro esperimenti (Bars: 20 μ m).

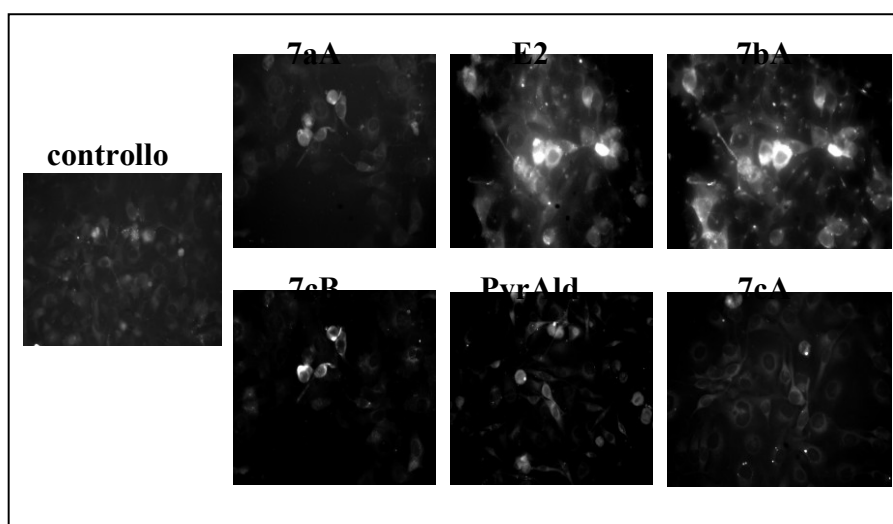


Figura 2.11: Effetto delle diverse molecole sul clivaggio della caspasi-3 in linee cellulari di tumore tiroideo umano follicolare (FTC-133) valutata al microscopio a fluorescenza Leika (Germania). I dati sono stati ottenuti esaminando 4 campi/vevtrino di quattro esperimenti (Bars: 20 μ m).

2.3.3 Molecular docking

Al fine di confermare e razionalizzare i risultati biologici osservati e per avere un quadro più chiaro della modalità di intercalazione, i complessi supramolecolari del DNA con i composti sintetizzati sono stati analizzati usando la modellistica molecolare. Il modello adottato consiste di tre fasi:

(1) i poli-d(AT)₂ e i poli-d(GC)₂ sono stati simulati come frammenti dodecamerici di (dA-dT)₂ e di (dG-dC)₂, e sono stati costruiti in conformazione di B-DNA utilizzando il programma HyperChem 7.5^[55] e minimizzati con Amber96, che è uno dei campi di forza più accurati ed ampiamente utilizzato per le proteine e per il DNA.^[56]

(2) Le simulazioni di tutti i composti legati a poly-d(AT)₂ e a poli-d(GC)₂, sono state effettuate, considerandone l'intercalazione tra le basi azotate appaiate, utilizzando la metodologia del docking.^[57] Dapprima il composto è stato inserito tra la sesta e la settima coppia di basi di ciascun frammento, sia dal solco minore sia da quello maggiore. Mentre le posizioni degli atomi del composto sono state mantenute fisse, il dodecamero è stato minimizzato in modo da rendere il frammento libero di modellarsi opportunamente sul ligando. Successivamente, l'intero sistema è stato minimizzato con un criterio di convergenza di 0,005 kcal/mol per Å, senza alcuna restrizione.

(3) Infine, sui sistemi ottenuti è stato effettuato un docking computazionale automatizzato applicando l'algoritmo genetico lamarckiano (LGA) implementato in AutoDock 4.2.3.^[58] Questo software è stato utilizzato perché è in grado di riprodurre fedelmente le strutture cristallografiche di piccoli ligandi che legano gli acidi nucleici, anche se le costanti di legame sono riprodotte solo semiquantitativamente.^[59] I risultati ottenuti hanno dimostrato che le molecole **7a-c** mostrano una chiara preferenza per il frammento di poli-AT intercalando dal solco minore.

Tabella 2.1: Energie di binding calcolate per i composti **7a-c** intercalati nel

dodecamero d(AT)₂.

Composto	ΔG_B^a dal solco minore
7aA	-10.2
7bA	-9.6
7cA	-9.8

^a Tutti i valori sono in kcal/mol.

L'interazione di **7aA** con le nucleobasi non comporta alcun legame idrogeno tuttavia si rileva un'ampia stabilizzazione a causa di interazioni idrofobiche e di van der Waals (Figura 2.7).

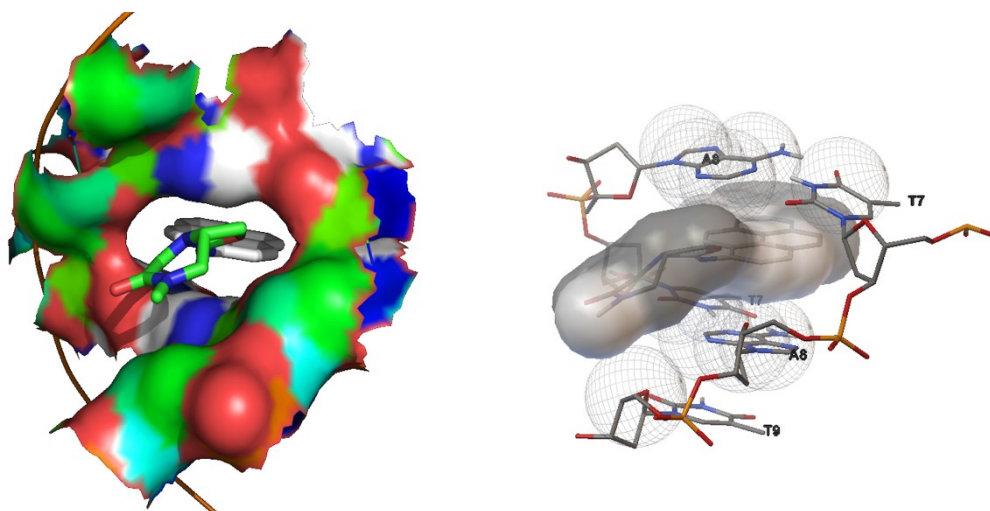


Figura 2.7.: Le sfere indicano le interazioni di van der Waals.

2.4 Conclusioni

Abbiamo condotto indagini preliminari al fine di verificare se le suddette molecole fossero intercalanti del DNA. I risultati preliminari da noi ottenuti hanno messo in evidenza che tutte le molecole si intercalano al DNA (dati non mostrati).

Sono in corso ulteriori ricerche per meglio comprendere il ruolo svolto dal TfR1 ed i meccanismi molecolari coinvolti nella sua over-espressione, anche per permettere lo sviluppo di terapie che compensino l'interruzione dell'uptake di ferro nel trattamento dei tumori tiroidei.

2.5 Parte sperimentale

Procedure generali. I punti di fusione non sono stati corretti. Gli spettri NMR sono stati registrati su uno spettrometro Varian UNITY Inova operante a 500, 200 e 400 MHz per il protone ed a 125 e 100 MHz per il carbonio 13 e sono stati riportati in ppm rispetto al TMS. La cromatografia su strato sottile è stata fatta con lastre Merck 60 F₂₅₄. Per la cromatografia su colonna abbiamo usato il gel di silice della Macherey-Nagel 60 M (0.040-0.063 mm). Tutte le reazioni che coinvolgono agenti sensibili all'aria, sono state condotte sotto atmosfera d'azoto. Tutti i reagenti sono stati acquistati dall'Aldrich o dalla Acros Chimica e sono stati utilizzati senza ulteriore purificazione. I solventi per cromatografia sono stati distillati sotto pressione atmosferica prima di essere utilizzati ed anidrificati con le procedure standard.

SINTESI DELLE AMMIDI 3

Procedura generale. Ad una soluzione di Boc-glicina **1** (1.2 eq) in diclorometano anidro (10 ml) si aggiunge alla temperatura di 0 °C, dicicloesilcarbodiimmide (DCC) (1.2 eq) e successivamente in sequenza, prima l'allilamina **2** (1 eq) e DMAP (4-dimetilamminopiridina) (1,5 % p/p). La reazione procede per 48 ore a temperatura ambiente e sotto vigorosa agitazione. La miscela di reazione è filtrata su buchner (Etere di petrolio/acetato di etile 7:3) evaporata a pressione ridotta per dare un olio.

[(Allil-cicloesil-carbamoil)-metil]-carbammato di terzbutile (3A). Resa 87%, olio incolore: ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 1.07-1.82 (m, 10H), 1.44 (s, 9H), 3.81 (d, 1H), 3.91 (d 1H), 4.01 (d, 1H), 5.08-5.23 (m, 2H); 5.41 (m, 1H), 5.52 (s, 1H), 5.68-5.89 (m, 1H). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): 25.1, 27.1, 27.96, 31.32, 53.82, 55.27, 55.92, 78.8reale, 115.68, 134.59, 155.48, 168.27.

[(Allil-phenil-carbamoil)-metil]-carbammato di terzbutile (3B). Resa 85%,

olio giallo chiaro: ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): δ 7.41-7.38 (m, 3H), 7.19-7.15 (d, 2H), 5.91-5.78 (m, 1H), 5.43 (br s, 1H), 5.15-5.10 (m, 2H), 4.30 (d, 2H), 3.61 (m, 1H), 1.44(s, 9H).

SINTESI DELLE UREE 6

Procedura generale. Ad una soluzione di allilammide *N*-Boc-protetta **3** (1 eq) in diclorometano (10 ml) si aggiunge acido trifluoroacetico (1.2 eq). La reazione è mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 2 ore. La miscela di reazione è evaporata a pressione ridotta, il residuo è ripreso con diclorometano e portato a pH 13 (soluzione 1M di NaOH), è addizionata acqua e si estrae con diclorometano (3 x 10 mL). Le fasi organiche vengono anidificate con Na_2SO_4 . La miscela è portata a secco a pressione ridotta. Viene isolato un olio incolore, che sciolto in THF (5 mL) è trattato con un appropriato isocianato **5a-c** (1 mmol). La soluzione è lasciata agitare a temperatura ambiente per una notte e poi il solvente è evaporato per dare un residuo grezzo che è stato cromatografato su colonna di gel di silice.

***N*-Allil-*N*-cicloesil-2-(3-fenilureido)-acetammide (6aA).** Eluente: Etere di petrolio-AcOEt 3:2. Solido bianco; resa 82%, Mp. 97 °C. IR (nujol): $\nu = 3301, 1750, 1654 \text{ cm}^{-1}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , miscela di due rotameri in 7:6) rotamero minore: δ 1.07-1.82 (m, 10H), 3.91 (d, $J = 4.8 \text{ Hz}$, 2H), 4.13 (s, 2H), 4.34-4.46 (m, 1H), 5.06-5.26 (m, 2H), 5.72-5.87 (m, 1H), 6.45 (br s, 1H), 7.00-7.03 (m, 1H), 7.24-7.28 (m, 2H), 7.32-7.36 (m, 2H) 7.64 (br s, 1H); rotamero maggiore: δ 1.07-1.82 (m, 10H), 3.47-4.59 (m, 1H), 3.94 (d, $J = 5.1 \text{ Hz}$, 2H), 4.23 (s, 2H), 5.06-5.26 (m, 2H), 5.72-5.87 (m, 1H), 6.45 (br s, 1H), 7.00-7.03 (m, 1H), 7.24-7.28 (m, 2H), 7.32-7.36 (m, 2H), 7.64 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) rotamero maggiore: δ 25.3 (t), 25.5 (t), 29.7 (t), 44.7 (t), 46.1 (t), 52.4 (d), 117.5 (t), 118.5 (d), 121.1 (d), 128.8 (d), 129.1 (d), 137.7 (s), 155.5 (s), 164.4 (s); rotamero minore: δ 25.3 (t), 25.4 (t), 29.3 (t), 44.5 (t), 46.1 (t), 47.6 (d), 116.8 (t), 118.5 (d), 121.1 (d), 128.8 (d), 129.1 (d), 138.3 (s),

155.6 (s), 164.4 (s).

***N*-Allil-*N*-cicloesil-2-(3-naftalen-1-ilureido)-acetammide (6bA).**

Eluente: etere di petrolio-AcOEt 3:2. solido beige; resa 75%, Mp. 173-174 °C. IR (nujol): $\nu = 3287, 1745, 1656 \text{ cm}^{-1}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , miscela di due rotameri in rapporto 4:3) rotamero maggiore: δ 1.02-1.79 (m, 10H), 3.74 (d, $J = 4.8 \text{ Hz}$, 2H), 4.11 (s, 2H), 4.19-4.32 (m, 1H), 4.98-5.16 (m, 2H), 5.56-5.72 (m, 1H), 6.73 (br s, 1H), 7.42-7.50 (m, 3H), 7.63 (br s, 1H), 7.82-7.86 (m, 2H), 8.08-8.13 (m, 2H); rotamero minore: δ 1.02-1.79 (m, 10H), 3.39-3.45 (m, 1H), 3.81 (d, $J = 5.4 \text{ Hz}$, 2H), 4.20 (s, 2H), 4.98-5.16 (m, 2H), 5.56-5.72 (m, 1H), 6.81 (br s, 1H), 7.42-7.50 (m, 3H), 7.67 (br s, 1H), 7.82-7.86 (m, 2H), 8.08-8.13 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) rotamero maggiore: δ 25.3 (t), 25.5 (t), 29.6 (t), 42.6 (t), 44.8 (t), 54.3 (d), 114.1 (s), 116.9 (t), 121.3 (d), 122.0 (d), 125.2 (d), 125.8 (d), 126.0 (d), 128.3 (d), 128.5 (s), 134.1 (d), 134.3 (s), 157.0 (s), 169.6 (s); rotamero minore: δ 25.3 (t), 25.4 (t), 29.2 (t), 42.4 (t), 44.3 (t), 56.4 (d), 114.1 (s), 116.1 (t), 121.1 (d), 121.9 (d), 125.1 (d), 125.5 (d), 125.9 (d), 128.3 (d), 128.5 (s), 133.7 (s), 134.5 (d), 156.9 (s), 168.4 (s).

***N*-Allil-*N*-cicloesil-2-(3-piren-1-ilureido)-acetammide (6cA).** Eluente: Etere di petrolio-AcOEt 3:2. solido marrone; resa 70%; ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 1.02-1.79 (m, 10H), 3.58-3.69 (m, 1H), 3.94-4.02 (m, 1H), 4.44 (d, 1H), 4.53 (d, 1H), 5.10-5.37 (m, 2H), 5.72-5.90 (m, 1H), 7.34 (br d, 1H), 8.00-8.24 (m, 8H), 8.70 (d, 1H);

***N*-Allil-*N*-fenil-2-(3-piren-1-ilureido)-acetammide (6cB).** Eluente: etere di petrolio-AcOEt 3:2. solido marrone; resa 67%, ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 3.81 (d, $J = 4.4 \text{ Hz}$, 1H), 4.15 (d, $J = 6.3 \text{ Hz}$, 2H), 4.90-4.99 (m, 2H), 5.61-5.74 (m, 1H), 6.30 (br s, 1H), 7.01-7.05 (m, 3H), 7.23-7.27 (d, 2H), 7.81 (br s, 1H), 7.98-8.05 (m, 3H), 8.11-8.30 (m, 6H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 24.9, 25.8, 29.22, 43.1, 45.8, 52.53, 118.38, 121.25, 122.76, 124.67, 124.72,

125.02, 125.31, 125.98, 126.50, 127.22, 127.53, 128, 128.6, 129.83, 130.92, 131.30, 132.15, 140.16, 156.94, 169.25.

Sintesi dei 3-arilimmino-1,7,8,8a-tetraidro-3H-ossazol[3,4-a]pirazin-6(5H)-oni 7.

Procedura generale. Alla soluzione dall'alchenilurea **6** (1 mmol) in tetraidrofurano anidro (3 ml) sono stati aggiunti in sequenza PdCl₂(MeCN)₂ (0,05 mmol) e CuCl₂ (3,0 mmol). La reazione è lasciata agitare per 24 ore a 60°C. Trascorso questo tempo viene aggiunta una soluzione satura di NaCl e la miscela è stata estratta con CH₂Cl₂ (3 x 10 mL). Le fasi organiche riunite vengono anidrificate su Na₂SO₄ e il solvente è portato a secco a pressione ridotta per dare un prodotto grezzo che è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice.

7-Cicloesil-3-fenilimmino-1,7,8,8a-tetraidro-3H-ossazol[3,4-a]pirazin-6(5H)-one (**7aA**). Eluente: etere di petrolio-AcOEt 3:7. Solido bianco; resa 85%, Mp. 155-156 °C. IR (nujol): $\nu = 1757, 1585 \text{ cm}^{-1}$; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.25-1.82 (m, 10H), 3.15 (dd, $J = 11.1, 9.3 \text{ Hz}$, 1H), 3.28 (dd, $J = 12.0, 3.8 \text{ Hz}$, 1H), 3.82-3.87 (m, 1H), 3.88 (d, $J = 17.8 \text{ Hz}$, 1H), 4.02 (dd, $J = 8.6, 4.4 \text{ Hz}$, 1H), 4.43 (dd, $J = 8.6, 7.4 \text{ Hz}$, 1H), 4.46-4.52 (m, 1H), 4.53 (d, $J = 17.8 \text{ Hz}$, 1H), 6.89-6.98 (m, 1H), 7.05 (d, $J = 7.6 \text{ Hz}$, 2H), 7.20-7.24 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 25.3 (t), 25.4 (t), 25.6 (t), 29.3 (t), 29.6 (t), 43.6 (t), 46.4 (t), 51.6 (d), 52.6 (d), 67.9 (t), 122.5 (d), 123.4 (d), 128.5 (d), 146.6 (s), 150.9 (s), 164.3 (s).

7-Cicloesil-3-(naftalen-1-ilimmino)-1,7,8,8a-tetraidro-3H-ossazol[3,4-a]pirazin-6(5H)-one (**7bA**). Eluente: Etere di petrolio-AcOEt 3:7. solido bianco; resa 69%, Mp. 175-176 °C. IR (nujol): $\nu = 1753, 1581 \text{ cm}^{-1}$; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.05-1.82 (m, 10H), 3.24 (dd, $J = 11.3, 10.6 \text{ Hz}$, 1H), 3.34 (dd, $J = 12.0, 3.9 \text{ Hz}$, 1H), 3.92-3.98 (m, 1H), 4.02-4.07 (m, 2H), 4.47 (dd, $J = 8.7, 7.2 \text{ Hz}$, 1H), 4.53-4.60 (m, 1H), 4.75 (d, $J = 18.3 \text{ Hz}$, 1H), 7.19-7.21 (m, 1H), 7.36-7.45 (m, 3H), 7.52 (d, $J = 8.2 \text{ Hz}$, 1H), 7.29-7.32 (m, 1H), 8.19-8.22 (m, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 25.3 (t), 25.4 (t), 25.6 (t), 29.3 (t), 29.7 (t), 43.6 (t), 46.6 (t), 51.7 (d), 52.6 (d), 67.8 (t), 117.4 (d), 122.6 (d), 124.1 (d), 124.9 (d),

125.7 (d), 125.8 (d), 127.7 (d), 129.3 (s), 134.3 (s), 142.8 (s), 150.9 (s), 164.4 (s).

7-Cicloesil-3-(piren-1-ilimmino)-1,7,8,8a-tetraidro-3H-ossazol[3,4-]pirazin-6(5H)-one (7cA). Eluente: Etere di petrolio-AcOEt 3:7. Solido giallo oro; resa 65%, ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1.05-1.82 (m, 10H), 3.34 (dd, *J* = 11.3, 10.6 Hz, 1H), 3.4 (dd, *J* = 12.0, 3.9 Hz, 1H), 4.02-4.07 (m, 1H), 4.16-4.12 (m, 2H), 4.56-4.60 (m, 2H), 4.85 (d, *J* = 18.3 Hz, 1H), 7.19-7.21 (m, 1H), 7.36-7.45 (m, 3H), 7.52 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.29-7.32 (m, 1H), 8.19-8.22 (m, 1H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 25.3, 25.4, 25.6, 29.3, 29.7, 43.7, 46.7, 51.9, 52.6, 68, 120.36, 123.6, 124.08, 124.19, 124.98, 125.36, 125.54, 125.73, 126.18, 127, 127.38, 131.57, 142.06, 151.77, 164.4.

7-fenil-3-(piren-1-ilimmino)-1,7,8,8a-tetraidro-3H-ossazol[3,4-a]pirazin-6(5H)-one (7cB). Eluente: Etere di petrolio-AcOEt 3:7. Solido beige; resa 67%, ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 3.58-3.66 (m, 2H), 3.94-3.89 (m, 1H), 4.06-4.09 (m, 2H), 4.52-4.55 (m, 2H), 5.04 (d, *J* = 18.8 Hz, 1H), 7.32 (d, 2H) 7.44 (t, 2H) 7.86 (d, *J* = 7.9 Hz 1H), 7.90-8.01 (m, 4H), 8.1-8.06 (m, 3H), 8.49 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 29.7, 31.6, 46.7, 46.9, 51.7, 52.8, 67.7, 96.12, 120.32, 123.6, 124.09- 124.26, 124.72, 124.96, 125.1, 125.54, 125.74-125.80, 126.19, 126.27, 127.03, 127.38, 127.52-127.56, 129.45, 129.51, 131.57, 131.62, 140.86, 141.87, 150.83, 165.05.

SINTESI DELL'ISOCIANATO 5C

Procedura generale. La soluzione dell'acido piren-1-il carbossilico **8** (1 eq) in cloruro di ossalile (10 ml) è lasciato agitare vorticosamente in atmosfera inerte a temperatura ambiente per 24 ore. Trascorso questo tempo il cloruro di ossalile in eccesso è rimosso a pressione ridotta, ottenendo così un solido giallo dalle venature arancio. Il solido solubilizzato in benzene anidro è portato a secco a pressione ridotta per eliminare le tracce del reagente in eccesso (10 ml x2). Al residuo, solubilizzato in benzene anidro (20 ml), è aggiunto goccia a goccia la TMSA (2ml). La miscela di reazione è lasciata ad agitare a temperatura ambiente

per 1 ora e successivamente a riflusso per 24 ore. Trascorso questo tempo il solvente viene rimosso a pressione ridotta. L'isocianato **5c** è un solido marrone rossastro. Resa: 81 %

Piren-1-il isocianato (5c). ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz): 7.70 (d, $J=8.3$ Hz, 1H), 7.97-8.04 (m, 4H), 8.09-8.22 (m, 4H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): 121.61, 123.0, 123.72, 124.01, 124.13, 125.05, 125.27, 125.47, 126.37, 126.66, 126.81, 126.87, 127.07, 127.19, 127.4, 128.2, 128.9, 130.9, 131.16, 131.25, 131.8, 135.8.

2.5.1 Molecular docking

Tutti i frammenti di poli-d(AT)₂ e di poli-d(GC)₂ sono stati chiusi alle estremità 3'-e 5' con un gruppo fosfato ed il sistema è stato trattato come un oligonucleotide completamente anionico. Successivamente, la geometria è stata completamente minimizzata con un criterio di convergenza di 0.005 kcal/mol per Å, assegnando un dielettrico di 1,0, dipendente dalla distanza, un fattore di scala 1–4 di 0,833 per la parte elettrostatica e di 0,5 per quella di Van der Waals, ed il cutoff di non legame in off.

Per il docking di alta precisione con AutoDock 4.2.3 sono stati utilizzati i seguenti parametri: spaziatura di griglia di 0,375 Å, numero di corse 25, numero di punti per ciascun asse 60 60 60 centrato sulla tasca, ga_num_evals 20 milioni, ga_pop_size 150 e ga_num_generations 27.000. L'interfaccia utente grafica AutoDockTools (1.5.6rc1, R45) ^[60] è stata utilizzata per stabilire i punti di Autogrid nonché la visualizzazione delle strutture dei complessi ligando-acido nucleico ottenute.

Parte 3: Sintesi di polimeri autorigeneranti mediante reazione di Diels Alder

3.1 Introduzione.

Nel campo della chimica organica contemporanea particolare importanza rivestono i polimeri, grazie alla loro versatilità e alla possibilità di realizzare con essi materiali cosiddetti “SMART”^[61].

Tali polimeri trovano oggi largo uso nei più disparati settori: dai veicoli, siano essi automobili, aerei o persino shuttle, agli articoli sportivi, dai materiali strutturali per le costruzioni all'elettronica di consumo, fino alle protesi biologiche.

Molti materiali perdono la loro integrità e/o funzionalità a causa dei processi degradativi. Questo deterioramento è principalmente causato dall'azione di:

1. **Sostanze dannose:** agenti ossidanti, sali, organismi viventi (virus, funghi e batteri).
2. **Fattori ambientali:** calore, luce, forze meccaniche esterne (vento e radiazioni).

Anche questi materiali sono suscettibili a danni meccanici, chimici, termici, fotochimici, o da una combinazione di questi fattori. Tali eventi portano alla formazione di microfratture nella matrice polimerica.

Numerosi sono gli esempi di questa tipologia di danno (Chamis e Sullivan, più recentemente Wilson et al. ^[62] per la riduzione di resistenza a trazione, Jang et al. ^[63] sulla delaminazione come causa della frattura della matrice, etc...) e le conseguenze possono essere in molti casi piuttosto gravi.

Numerose tecniche sono state sviluppate e adottate per la riparazione di danni visibili sulla struttura polimerica. Questi convenzionali metodi di riparazione non sono però applicabili a microfratture strutturali invisibili. Per superare questo limite, già nel 1980 è stato proposto il concetto di polimeri **self-healing**, suscitando grande interesse nel mondo accademico ed industriale. Concettualmente i polimeri self-healing hanno la capacità di auto-ripararsi dopo un danno.

L'autoriparazione è una proprietà intrinseca degli organismi viventi (**bio-self-**

healing).

Uno fra i più affascinanti esempi di bio-self-healing è la “ristrutturazione” delle ossa rotte: il tessuto osseo danneggiato, viene rimosso e rimpiazzato da quello nuovo mentre le strutture che sono più esposte a stress vengono correate da materiale addizionale, con la finalità di rinforzo. Questo compito è svolto da specifiche cellule che sono parte integrante del tessuto osseo. Esse lavorano come dei sensori, ”sentendo” le potenziali deformazioni e contemporaneamente attivando altre cellule che rimuovono il tessuto danneggiato, rigenerando il nuovo. Il principio costitutivo dei polimeri self-healing trae la sua fonte d’ispirazione dalla natura e dalla sua perfetta organizzazione nel rispondere agli stimoli esterni. La riparazione è un processo che deve garantire: l’identificazione, la localizzazione e il ripristino del danno.

Nei polimeri self-healing questa riparazione può avvenire secondo due diverse metodologie:

- autonomamente,
- oppure attivata da uno specifico stimolo esterno (calore o radiazioni).

Un self-healing ideale è, quindi, capace in maniera continua di percepire e rispondere al danno, ripristinando le condizioni originarie senza indurre alterazioni negative sul materiale.

Il processo di riparazione è relativo al ripristino delle proprietà meccaniche del materiale quali resistenza alla frattura (elasticità), resistenza alla trazione.

L’efficienza del processo di riparazione è determinato dalla seguente equazione:^[74] ***Efficienza del riparo = 100 x (Quantità di prodotto riparato/Prodotto iniziale).***

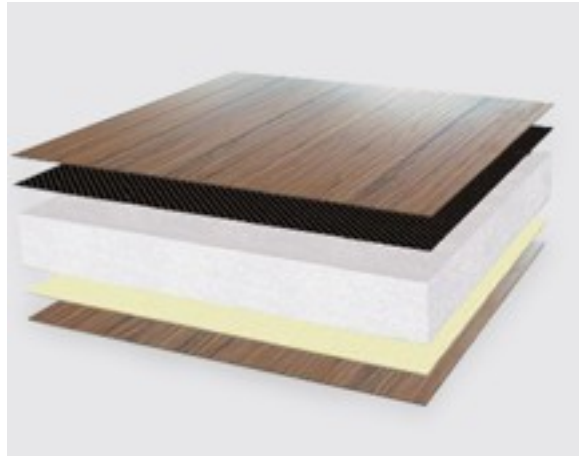


Fig. 3.1 Matrice polimerica ultraleggera.

3.1.1 La frattura.

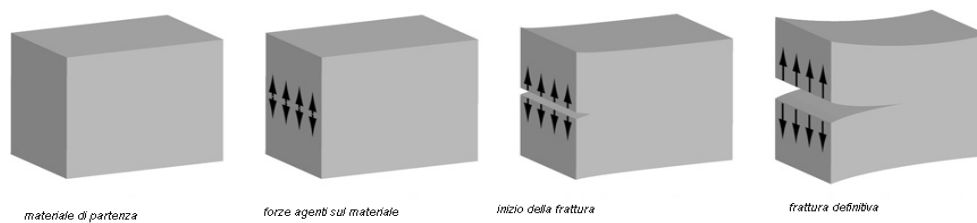


Fig. 3.2

Abbiamo già fatto riferimento ai vari fattori esogeni come calore, sostanze chimiche e radiazioni UV, che possono causare danni al materiale polimerico. Gli urti, associati a sollecitazioni cicliche, ricevono la maggior attenzione per le applicazioni strutturali di questo tipo di materiali. Queste sollecitazioni lesionano il polimero, e aggravano il danno attraverso la propagazione della frattura come conseguenza dell'urto. L'attento studio dell'estensione della lesione ha portato alla conclusione che l'energia rilasciata durante la rottura deve essere uguale, o maggiore, rispetto all'energia richiesta per generare nuove superfici sul materiale. È possibile ritardare l'espansione della frattura dissipando l'energia all'interno del materiale che impatta.

Esistono due approcci per ritardare la propagazione della frattura:

- **Intrinseco**, attraverso la selezioni di appropriati monomeri e agenti curativi ^[88,89], o con l'uso di additivi o modificatori. ^[93,95]
 - **Estrinseco**, incrementando la dissipazione di energia.
-

Uno fra i più comuni tra questi meccanismi è il **patching**. Consiste nella copertura della superficie fratturata con una “patch”, che opera come una barriera al danno diminuendo lo stress nella zona di punta della frattura, ritardando, in questo modo, la propagazione della lesione e ripristinando l’integrità strutturale del polimero.

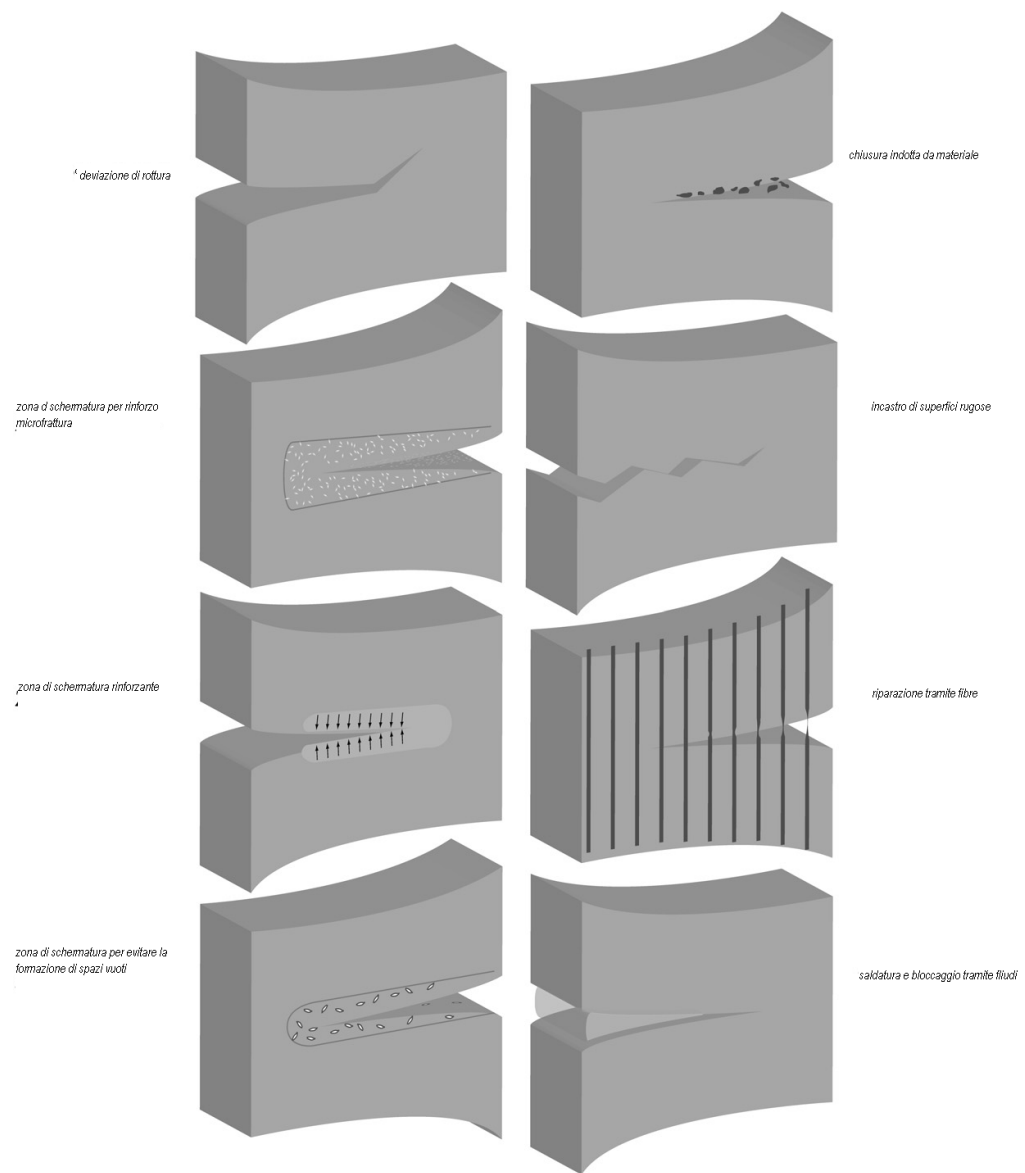


Fig. 3.3

3.1.2 Gestione del danno.

L'obiettivo della ricerca di nuovi materiali è stato fino ad oggi, maggiormente focalizzato sulla **prevenzione del danno**. Tuttavia questo approccio si scontra con il naturale degrado cui qualsiasi materiale, più o meno velocemente, va incontro. Resta dunque fondamentale la manutenzione, resa sempre più complessa e costosa dall'avanzare del progresso tecnologico.

Al fine di limitare i costi legati alla manutenzione dei materiali, ha preso sempre più piede una nuova strategia basata non più sulla prevenzione del danno, bensì sulla gestione di quest'ultimo: il “**damage management**”.

La chiave di volta di questo concetto risiede nella progettazione di strutture, che riescano esse stesse a porre rimedio all'insorgenza di un danno, senza interventi esterni. E' evidente come lo studio e la ricerca di materiali self-healing rivestano quindi un ruolo determinante nella realizzazione di strategie di damage management.

3.1.3 Tipologie di materiali autoriparanti.

In questo paragrafo sono descritte alcune delle più interessanti proposte per l'utilizzo di materiali self-healing.

Microcapsule.

Questo tipo di approccio, prendendo spunto dalla natura, prevede la dispersione all'interno della matrice polimerica di microcapsule, riempite del monomero base in fase liquida, e di un composto capace di catalizzare la reazione di polimerizzazione.

In caso di formazione di microfessure, le microcapsule nell'intorno della frattura si rompono rilasciando monomero e catalizzatore che, entrando in contatto,

reagiscono dando vita ad una polimerizzazione in grado di generare nuovo polimero, riportando il materiale alle sue condizioni originali.

L'uso di microcapsule richiede attenzioni particolari ad alcuni parametri:

- **Dimensione delle capsule:** devono essere sufficientemente grandi da poter contenere un'adeguata quantità di agente riparante, ma tali da non influenzare le proprietà meccaniche della matrice.
 - **Spessore delle pareti delle microcapsule:** devono essere sufficientemente sottili da rompersi in presenza della cricca, ma contemporaneamente tali da garantire l'impermeabilità rispetto al liquido contenuto.
 - **Dispersione del catalizzatore:** deve essere ripartito uniformemente all'interno della matrice polimerica, in modo da entrare facilmente in contatto con l'agente riparante.
 - **Reazione di polimerizzazione:** deve avvenire spontaneamente al contatto tra monomero liquido e catalizzatore, con tempi di reazione molto brevi.
-

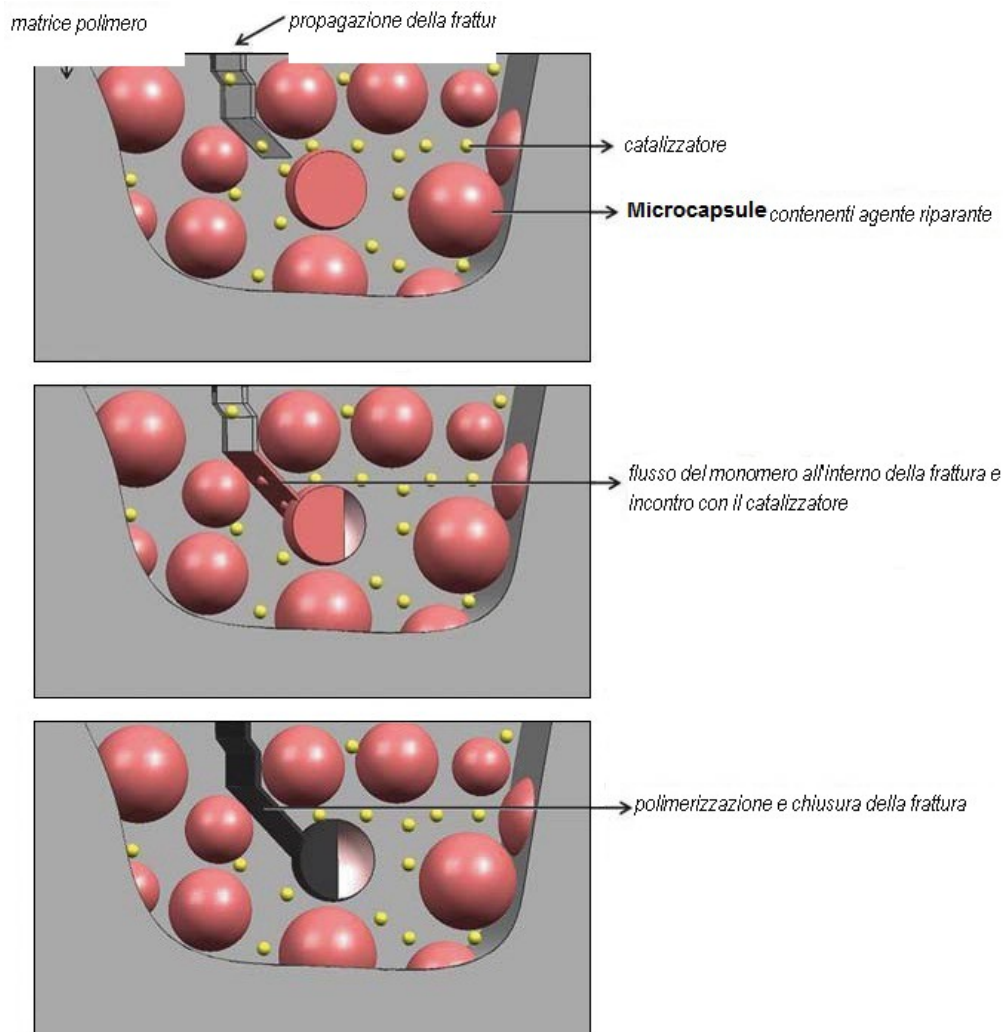


Fig. 3.4

Un ottimo sistema di auto-riparazione a microcapsule deve:

1. Essere facilmente incapsulabile.
2. Rimanere stabile, reattivo e resistere alle diverse condizioni ambientali.
3. Rispondere velocemente al danno e ripararlo.
4. Essere efficiente nel rilascio dell'agente di riparazione nel sito danneggiato.
5. Avere minimi effetti avversi sulle proprietà del materiale.

Questo sistema è ottimo per riparazioni a livello microscopico. Si è dimostrato invece del tutto inefficace nel caso di danni macroscopici. Ulteriore vantaggio di

questa tecnica è, la sua potenziale applicazione ad altri tipi di materiali come ceramiche e vetro.

I risultati più interessanti sono stati raggiunti attraverso l'uso del catalizzatore di Grubbs di 1° generazione. Questa tecnica sfrutta due possibili strategie di polimerizzazione:

- **ROMP** = ring opening metathesis polimerization
- **PROMP** = photo induced ring opening metathesis polimerization.

Le microcapsule più utilizzate sono fatte in poli-urea-formaldeide, con una dimensione dell'ordine di 100µm, e riempite con poli-diciclopentadiene (DCPD) in qualità di agente riparante. Queste vengono disperse in una matrice di resina epossidica “drogata“ con il catalizzatore di Grubbs, che, di norma, agirà secondo lo schema ROMP.

Questo perché il sistema DCPD/Grubbs cat. presenta dei vantaggi come: bassa viscosità del monomero, bassa volatilità, polimerizzazione a temperatura ambiente in alcuni minuti e formazione di materiale di riempimento altamente reticolato (cross-linked) e resistente.^[69]

<i>DCPD</i>	<i>catal. di Grubbs</i>	<i>ROMP (142)</i>
<i>ENB</i>	<i>catal. di Grubbs</i>	<i>ROMP (143)</i>

Tabella 3.1 Principali meccanismi di riparazione tramite microcapsule.

La riparazione tramite microincapsulazione, presenta però anche degli svantaggi, primo su tutti la non ripetibilità dell'effetto. Una volta che le microcapsule si sono schiuse, infatti, è impossibile il loro riutilizzo. Un'altra problematica di questo metodo risiede nella coesistenza di due fasi distinte, una solida (costituita dalla matrice e dal catalizzatore), e una liquida (formata dall'agente riparante).

Materiali compositi autoriparanti.

La ricerca di materiali termoindurenti, segue il vasto impiego che essi trovano nelle applicazioni strutturali. Tali applicazioni generalmente richiedono materiali rigidi con stabilità termica. La rigidità e la stabilità termica sono ottenute tramite una struttura molecolare altamente reticolata, ovvero **cross-linked**. Ciò significa che questi polimeri non possiedono mobilità sulle catene laterali. A causa della loro struttura molecolare lo sviluppo dei cross-linked termoindurenti ha seguito diverse strade.

Il denominatore comune per questi materiali è l'incorporazione del polimero all'interno di fibre cave. Tali materiali, non più semplici polimeri ma compositi, sono infatti di norma composti da una matrice polimerica rinforzata con fibre secondo uno schema "**vascolare**", che consenta l'accumulo dell'agente riparante, in questo caso di una resina a bassa viscosità, all'interno delle fibre.

Anche la vascolarizzazione del materiale composito, come la microincapsulazione, è un'idea comune ai meccanismi biologici di autoriparazione, (per esempio nelle piante).

Normalmente sono usate resine a base di cianoacrilato o di epossidi, che vengono coniugate rispettivamente con fili metallici e perle di vetro (Bleay et al.).

La funzione di questo sistema è di rinforzare la struttura e nel contempo di contenere il self-healing.

Il riempimento con cianoacrilato non è comunque ideale, in quanto questo composto polimerizza molto velocemente, causando quindi un intasamento a livello della fibra. La resina epossidica, invece, si è dimostrata molto più flessibile, sebbene sia necessaria una riduzione della sua viscosità prima che possa essere riversata nella frattura. Ciò viene ottenuto riscaldando fino a 60°C e aggiungendo circa 40% di acetone alla resina. Quest'ultimo metodo si è dimostrato più efficace benché il potere di riparazione non superi l'89%.

Di rilevante importanza sono:

1. la natura e la localizzazione della frattura;
2. il tipo di resina autoriparante;
3. l'influenza delle condizioni in cui si opera.

Inizialmente questo concetto di materiale termoindurente fu applicato a materiali cementizi, ma la grande flessibilità del modello ha permesso la sua estensione ai materiali compositi a base polimerica.^[68] Il principale vantaggio di questo design è di assicurare un flusso continuo di self-healing nella zona danneggiata, impossibile da garantire con la tecnica delle microcapsule. Inoltre la presenza delle fibre aumenta le prestazioni meccaniche. È poi possibile di infittire la rete di fibre nelle zone più esposte ai danneggiamenti. La presenza del catalizzatore, disciolto nella matrice, assicura la reazione di polimerizzazione una volta che l'agente riparante è fuoriuscito dal sistema vascolare.

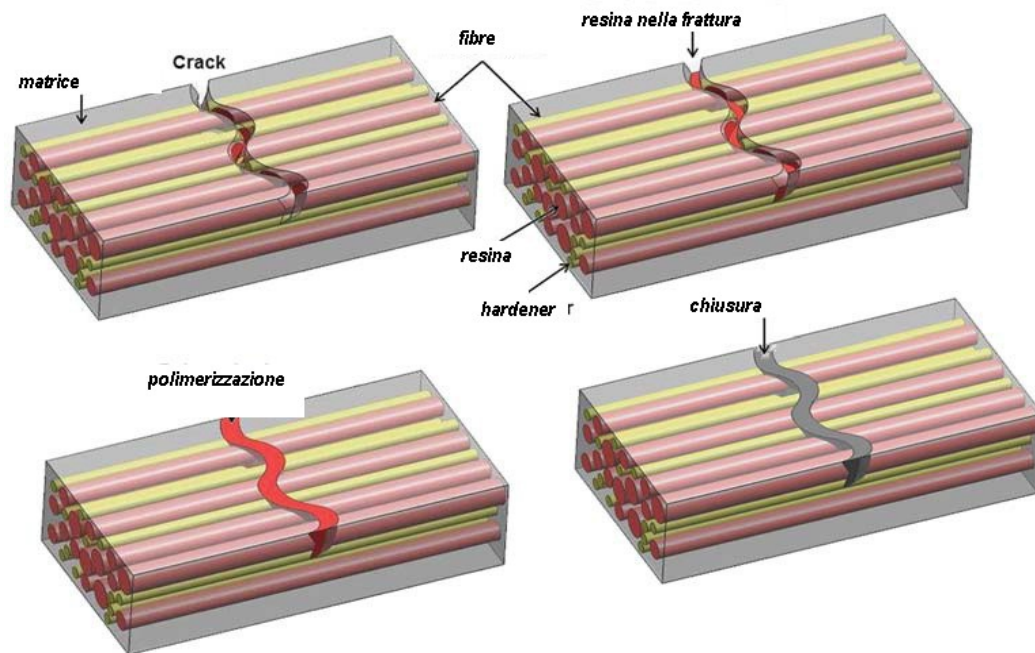


Fig.3.5 Processo di autoriparazione con fibre contenenti resina.

Sono state sviluppate diverse architetture del sistema vascolare come:

1. **fibre di vetro cave**: consentono al materiale di recuperare fino al 97% delle sue prestazioni meccaniche originarie.
2. **Nanotubi di carbonio**: conferiscono al materiale resistenza meccanica e conducibilità elettrica e possono essere usati per l'approvvigionamento dell'agente riparante.
3. **Sistemi micro vascolari**: studiati e realizzati per riprodurre la rete di capillari tipica del derma umano. Consentono un regolare afflusso di resina in ogni parte del materiale e garantiscono un'efficienza di riparazione dell'80%.

Gli svantaggi di questi sistemi risiedono nella dimensione dei vasi, nel loro riempimento e nell'impiego di resine a bassa viscosità.

Riparazione mediante riscaldamento.

Una proprietà molto ricercata nei materiali autorigeneranti è la **ripetibilità**

dell'azione autoriparante. Questa può essere garantita grazie all'applicazione in situ di uno stimolo esterno, come il calore. I più recenti studi hanno investigato i diversi meccanismi di rigenerazione, con l'obiettivo di garantire la ripetibilità dell'effetto autoriparante il maggior numero di volte possibile.

In particolare, due meccanismi hanno mostrato risultati promettenti:

- **legami a idrogeno:** presentano un'energia di legame molto più bassa rispetto ai legami covalenti, per questo motivo è molto più facile scinderli e riformarli. Ciò ha consentito lo sviluppo di materiali autorigeneranti che richiedessero uno stimolo esterno di minore entità. Tali materiali, infatti, possono essere riparati semplicemente avvicinando i due lembi della frattura. Tuttavia è necessario che i due lembi siano avvicinati il più rapidamente possibile dopo il danno, in quanto le unità altamente reattive dei legami a idrogeno potrebbero reagire con le altre presenti sullo stesso lembo, rendendo impossibile la riparazione. Ciò costituisce il più grosso limite nell'applicazione di questa tecnica.
- **Reazione di Diels-Alder:** la formazione di legami, controllata termicamente, è molto conosciuta in chimica organica e può essere applicata alla formazione di polimeri lineari. Ideale a tal proposito è la cicloaddizione [4+2] Diels-Alder, scoperta nel 1928,^[89] onorata del premio Nobel nel 1950, e considerata tutt'oggi la "Monna Lisa" delle reazioni organiche per la sua bassa richiesta di energia per la formazione di legami covalenti connessi a strutture cicliche. Questa reazione, essendo termicamente reversibile, trova una perfetta coniugazione con il concetto di self-healing.

Particolarmente studiata è la reazione di DA tra il furano e i derivati della maleimmide. Questa metodologia fu applicata per la prima volta nel 1969 per lo sviluppo e la sintesi di particolari polimeri reticolati, ottenuti a 100°C in una forma gommosa, che tornava allo stato originale a 140°C.^[90] È proprio la formazione di legami termicamente reversibili a permettere l'esistenza di proprietà di auto-riparazione a seguito di stimolo termico.

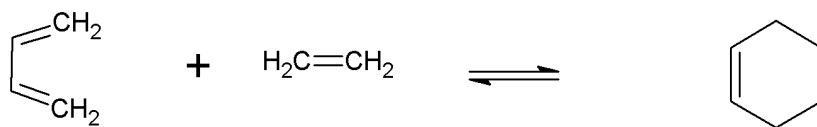


Fig. 3.6 Rappresentazione schematica di una cicloaddizione di DA

Le proprietà di self-healing dei materiali così ottenuti sono giustificabili dallo sviluppo di cross-linked, capaci di autoripararsi attraverso la formazione di legami covalenti termicamente reversibili.

Le proprietà meccaniche di questo tipo di polimeri possono essere paragonate alla resine epossidiche, comunemente usate per rinforzare i materiali compositi.

L'uso di cross-linked termicamente reversibili rende inutile la presenza agenti rigeneranti e catalizzatori disciolti nella matrice polimerica.

Molti autori concordarono che un self-healing è da considerarsi tale quando l'agente di riparazione e la fonte di calore sono integrati nello stesso sistema.

Chen et al. furono i pionieri di questo approccio. Descrissero il significato di “re-mendable materials”, materiali capaci cioè di attuare molteplici cicli di frattura/rigenerazione. Questa nuova tecnica offriva una valida alternativa alla microincapsulazione, in quanto eliminava la presenza di catalizzatori e di speciali trattamenti per il monomero.

La prima generazione di un polimero reticolato cross-linked è stata realizzata da Chen e altri secondo la figura 3.7:

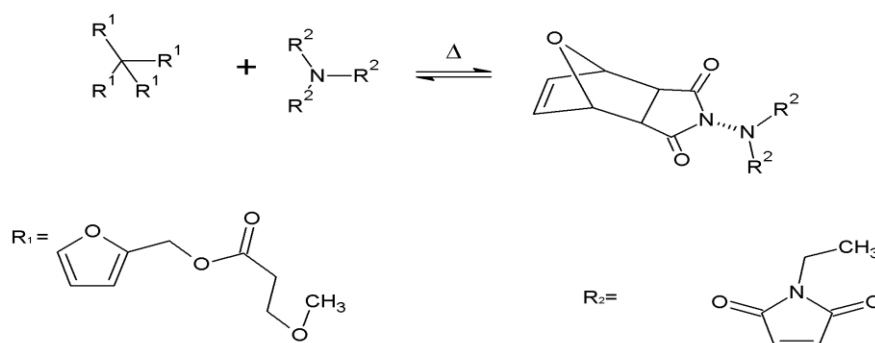


Fig. 3.7

Tale polimero è stato ottenuto per reazione di cicloaddizione [4+2] tra un derivato furanico e uno maleimmidico.

La forza di legame tra furano e maleimide è più bassa rispetto a quella di altri legami covalenti. Per questo motivo spesso la frattura di un polimero di questo

tipo può essere generata dalla rottura di questo legame secondo una reazione di retro-DA.

Il meccanismo di riparazione dipende, quindi, dalla formazione e rottura dei legami covalenti insiti nella reazione di DA. Così il processo di riparazione viene regolato dalla temperatura, in quanto i legami intermolecolari che si formano tramite la reazione di DA sono scissi se sottoposti per es. a 120°C, per poi riformarsi dopo raffreddamento.

Ulteriori progressi sono stati raggiunti dallo stesso gruppo di ricercatori nello sviluppare, attraverso una polimerizzazione allo stato solido, una seconda generazione di questo tipo di polimeri. Questo nuovo polimero è stato ottenuto con il seguente procedimento:

- un riscaldamento ciclico a 115°C per 30 minuti;
- seguito da raffreddamento a 40°C per 6 ore.

I risultati ottenuti descrivono un'efficienza di rigenerazione intorno all'80% per il primo ciclo di frattura, che diventa di circa 78% per il secondo. L'elevato tasso di rigenerazione e la sostanziale consistenza tra primo e secondo ciclo rende i polimeri reticolati di seconda generazione particolarmente interessanti per ulteriori sviluppi futuri.

3.1.4 Strategie di formazione dei cicli

Le condensazioni

Le reazioni che portano alla formazione di un ciclo, come d'altra parte qualsiasi reazione organica, possono essere suddivise in tre grandi classi:

- a) Reazioni di condensazione nucleofilo-elettrofilo;
- b) Reazioni radicaliche;
- c) Reazioni pericicliche.

Ci siamo qui occupati di reazioni di cicloaddizione, in particolar modo delle Diels-Alder.

Le reazioni pericicliche

Si chiamano reazioni pericicliche dei processi concertati, senza formazione di intermedi di reazione, nei quali lo stato di transizione adotta una disposizione ciclica. Sono processi concertati quelli in cui si ha una sincrona rottura e formazione di legami. Sono trasformazioni stereo e regio specifiche.

Queste reazioni non possono essere classificate né come ioniche (i cui processi coinvolgono doppietti elettronici), né come radicaliche (che avvengono grazie alla presenza di elettroni spaiati). In questi processi sono infatti direttamente coinvolti più elettroni presenti in diversi orbitali molecolari e si ha la rottura e formazione di più legami σ .

Vi sono quattro tipi di reazioni pericicliche:

- 2 Sigmatropiche;**
 - 3 Elettrocicliche;**
 - 4 Cheletropiche;**
 - 5 Cicloaddizioni.**
-

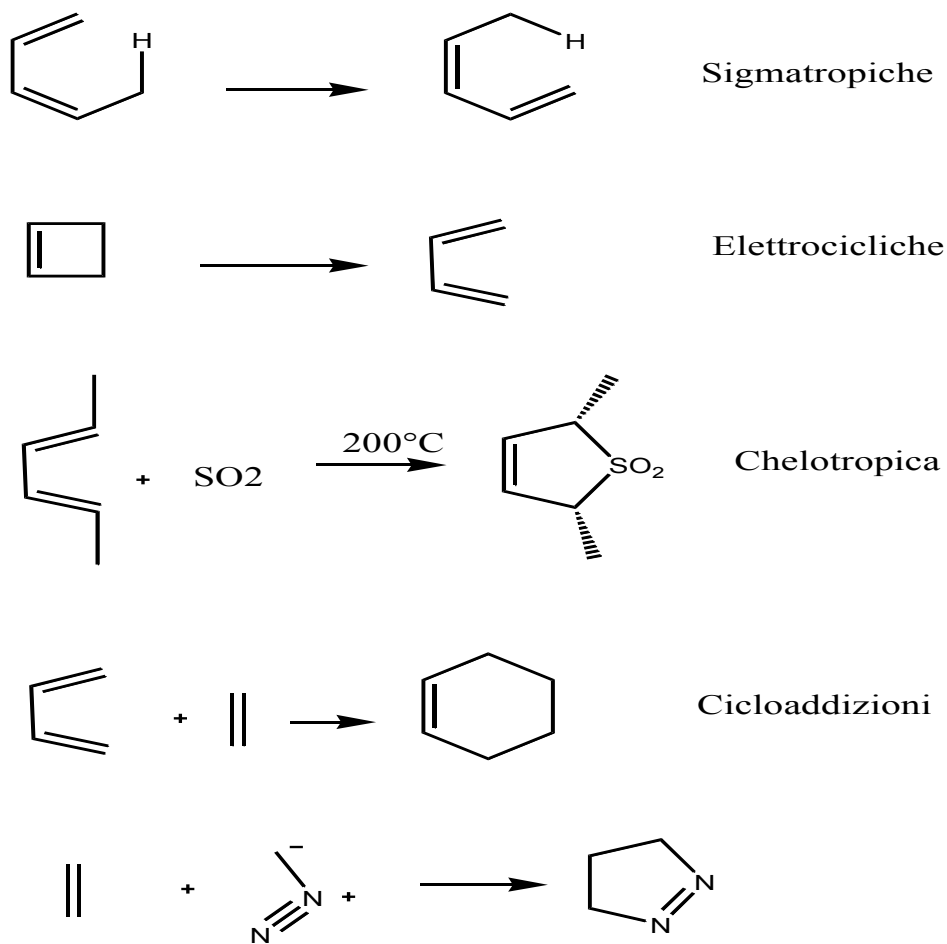


Fig. 3.8

Vi sono essenzialmente quattro problematiche legate alle reazioni pericicliche:

1. Reazioni permesse e proibite per simmetria

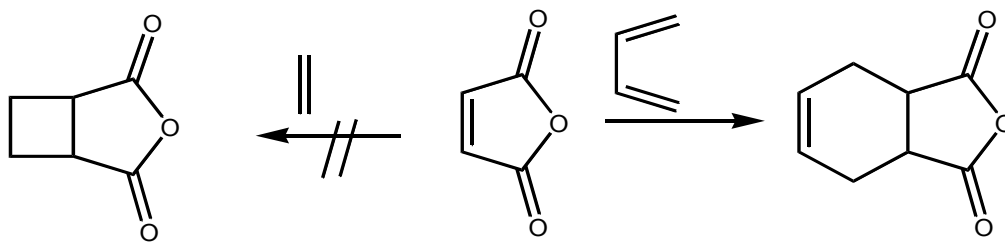


Fig. 3.9

Il concetto di *permesso* e *proibito* per una trasformazione periciclica è legato alla teoria della conservazione della simmetria degli orbitali molecolari delle molecole interagenti. Le reazioni permesse per simmetria hanno una bassa energia di attivazione e pertanto possono avvenire. Le reazioni proibite per simmetria sono sfavorite a causa di un alto valore dell'energia di attivazione: in questi casi la reazione può decorrere attraverso un meccanismo non concertato (non si tratta quindi più di reazioni pericicliche).

L'approccio allo studio della simmetria degli elettroni interagenti può essere affrontato a vari livelli, di precisione crescente:

a) ***Metodo degli FMO***

Si studia la simmetria soltanto degli orbitali molecolari di frontiera. Su questo metodo sono basate le classiche (metà anni '60), ma ancora molto valide regole di selezione di Woodward-Hoffmann.

b) **Metodo degli orbitali molecolari.**

Longuet-Higgins criticò l'approccio FMO affermando che tutti gli orbitali molecolari del reagente e del prodotto vanno considerati secondo la loro simmetria. Woodward e Hoffmann recepirono questa critica ed elaborarono alla fine degli anni '60 una nuova trattazione che rimane ancora oggi il migliore contributo sulla simmetria degli MO e sulla previsione del decorso delle reazioni pericicliche.

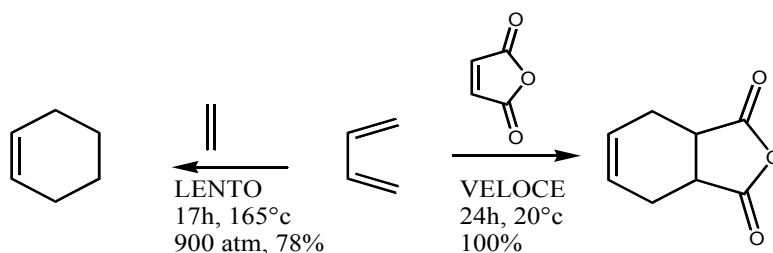
c) **Metodo degli stati molecolari.**

Questo metodo, elaborato da Woodward-Hoffmann contemporaneamente al precedente, studia la simmetria degli stati molecolari e delle configurazioni elettroniche delle molecole interagenti.

2. Effetto dei sostituenti

L'effetto dei sostituenti è molto importante nelle reazioni pericicliche, poiché influisce, anche notevolmente, sulle energie degli MO interagenti.

Fig 3.10



3. Stereochimica.

Le reazioni pericicliche sono reazioni stereospecifiche. Oltre alla creazione di centri stereogenici in modo stereospecifico, può esistere un'ulteriore stereoselezione.

4. Regiochimica.

Le reazioni pericicliche sono trasformazioni regiospecifiche. La regiospecificità non viene prevista considerando, anche solo formalmente, la reazione come un doppio processo nucleofilo-elettrofilo, e non può essere interpretata sulla base delle densità di carica dei reagenti, ma viene razionalizzata e prevista in termini degli orbitali molecolari di frontiera (coefficienti atomici siti interagenti). Per sistemi neutri entra infatti in gioco il terzo termine dell'equazione di Klopman-Salem (in forma semplificata):

$$\Delta E = - \underbrace{\frac{Q_{nuc}Q_{elec}}{\epsilon R}}_{\text{second term}} + \underbrace{\frac{2(c_{nuc}c_{elec}\beta)^2}{E_{HOMO} - E_{LUMO}}}_{\text{third term}}$$

Ancora una volta abbiamo quindi bisogno di conoscere le energie e i coefficienti atomici (c) degli HOMO e dei LUMO.

3.1.5 Le cicloaddizioni.

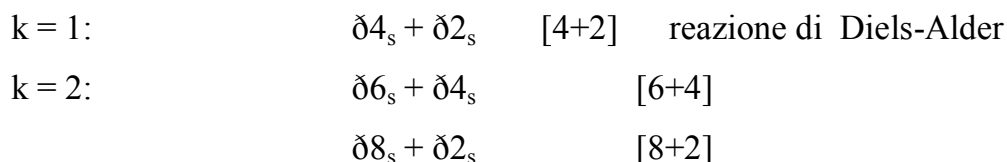
Le cicloaddizioni sono reazioni pericicliche nelle quali un sistema a n elettroni π reagisce con un sistema a m elettroni π per dare un ciclo contenente (m+n-4) elettroni π : verrà detto cicloaddizione [m+n].

Nella trasformazione, si ha la contemporanea formazione di due legami π (+4 elettroni σ). Possono essere permesse o proibite per simmetria, secondo le regole di Woodward-Hoffmann, come riportato nella seguente tabella:

<i>Tabella 1 - Regole di selezione per reazioni di ciclo addizioni [m+n]</i>		
m+n	termicamente permessa fotochimicamente proibita (stato fondamentale)	termicamente proibita fotochimicamente permessa (stato eccitato)
4q+2	m_s+n_s m_a+n_a	m_s+n_a m_a+n_s
4q	m_s+n_s m_a+n_a	m_s+n_s m_a+n_a

Si noti che per cicloaddizioni *supra supra* termicamente permesse, il totale degli elettroni σ impegnati nella cicloaddizione uguaglia gli elettroni dei sistemi aromatici secondo Hückel: $4k+2$.

Pertanto ad esempio:



Per cicloaddizioni *supra supra* termicamente proibite il totale degli elettroni σ uguaglia gli elettroni dei sistemi antiaromatici secondo Hückel $4k$.



Un esempio d'interazione antara-supra [$\sigma 14a + \sigma 2s$], ovvero interazione antarafacciale rispetto al sistema che interagisce con 14 elettroni σ e suprafacciale rispetto al sistema con 2 elettroni σ .

Da quanto detto in precedenza è chiaro che la simmetria degli orbitali HOMO e LUMO determina la possibilità che una ciclo addizione avvenga o meno. Ma quale delle due molecole reagisce col suo HOMO oppure col suo LUMO?

Le interazioni possibili ad esempio una [4+2] sono due: HOMO_{diene}-LUMO_{dienofilo} oppure LUMO_{diene}-HOMO_{dienofilo} riportate rispettivamente qui sotto.

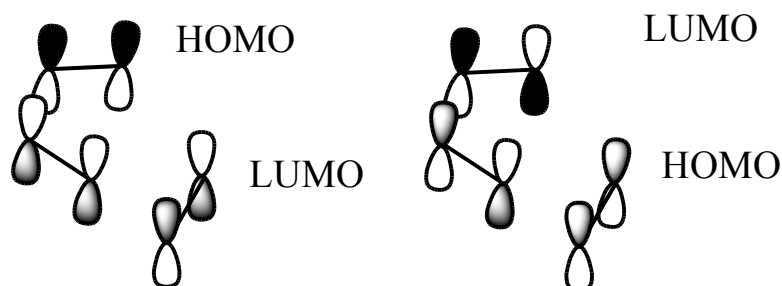


Fig. 3.11

Entrambe le interazioni sono ammesse per simmetria; tuttavia per il terzo termine dell'equazione di Klopman-Salem avviene la reazione ove si verifichi la minore differenza $E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}$.

L'interazione favorita è quella $\text{HOMO}_{\text{diene}} - \text{LUMO}_{\text{dienofilo}}$.

Analizziamo con attenzione il terzo termine dell'equazione della Klopman-Salem semplificata:

$$\frac{2(c_{\text{nuc}}c_{\text{elec}}\beta)^2}{E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}}$$

I passaggi da seguire sono i seguenti:

- 1) La simmetria degli HOMO e dei LUMO determina se una cicloadizione è permessa o proibita.
- 2) Se permessa il gap energetico nelle coppie HOMO-LUMO determina quale coppia fra le possibili è favorita nella reazione.
- 3) Determinata la coppia HOMO-LUMO che interagisce, il termine $(c_{\text{nuc}}c_{\text{elec}}\hat{\alpha})^2$ determina la regiochimica della reazione:

grande si accoppia con *grande*

piccolo si accoppia con *piccolo*

In questo modo infatti l'integrale di risonanza $\hat{\alpha}$ è massimizzato.

Grazie a questo approccio sono state razionalizzate le regiochimiche di alcune reazioni non spiegabili in termini di densità di carica.

Per prevedere la regiochimica di una cicloaddizione bisogna:

- α) Stimare le energie dell'HOMO e del LUMO per entrambi i componenti.
- β) Identificare quale coppia HOMO-LUMO è più vicina in energia.
- χ) Per questa coppia stimare i coefficienti degli AO sugli atomi coinvolti nella formazione dei legami.
- δ) Accoppiare i coefficienti maggiori di un componente con i maggiori dell'altro.

Prendendo ad esempio la reazione di Diels-Alder: qual è l'effetto dei sostituenti presenti sul diene e sul dienofilo ai fini della reattività e della regiochimica della reazione di cicloaddizione? L'influenza dei sostituenti sia sulle energie dell'HOMO e del LUMO, sia sul valore dei coefficienti, è molto importante. È possibile stimare tale effetto tenendo conto delle caratteristiche mesomeriche e polari-induttive del sostituente.

Iniziamo a stimare la variazione degli FMO al variare del sostituente. Al variare dell'energia degli FMO, il $\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}}$ può variare considerevolmente da una reazione all'altra.

Pertanto si hanno i seguenti effetti:

SOSTITUENTE	Effetto sull'energia degli FMO del dienofilo
- C = sostituente con effetto coniugativo (vinile, fenile)	Alza HOMO Abbassa LUMO
- Z = sostituente EA (CHO, CN, COOR, NO ₂ , ...)	Abbassa HOMO e LUMO
- X = sostituente ED (OR, NR ₂ , alk, ...).	Alza HOMO e LUMO

Per le reazioni di Diels-Alder classiche, e più comuni, quelle cioè in cui si ha l'interazione $\text{HOMO}_{\text{diene}} - \text{LUMO}_{\text{dienofilo}}$, si ha che:

- sostituenti EA sul dienofilo favoriscono la reazione;
- sostituenti ED sul dienofilo sfavoriscono la reazione.

Per reazioni di Diels-Alder invertite, in cui si ha l'interazione $\text{LUMO}_{\text{diene}} - \text{HOMO}_{\text{dienofilo}}$, il discorso è esattamente l'opposto.

L'effetto dei sostituenti non varia rispetto a quanto già visto; tuttavia poiché il diene reagisce col suo HOMO nelle Diels-Alder classiche, si ottiene il risultato opposto:

- sostituenti EA sul diene sfavoriscono la reazione;
- sostituenti ED sul diene favoriscono la reazione.

Finora abbiamo esaminato gli FMO di molecole allo stato fondamentale, ovvero abbiamo esaminato le reazioni di cicloaddizione permesse per via termica. Passiamo ad esaminare velocemente le reazioni di cicloaddizione che avvengono per stimolazione fotochimica. Quando una molecola assorbe una quantità di energia pari a $h\nu$, e quindi passa allo stato eccitato.

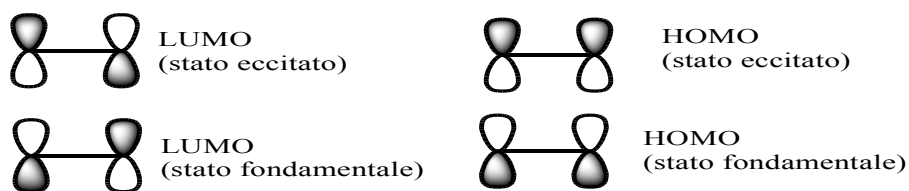


Fig. 3.12

L'HOMO e il LUMO della molecola allo stato fondamentale interagiscono con "l'HOMO" e il "LUMO" della molecola allo stato eccitato. La notazione virgolettata indica i rispettivi orbitali singolarmente occupati dello stato eccitato.

Cicloaddizione Diels-Alder.

La reazione tra *butadiene* ed *etilene* rappresenta il caso più semplice di un procedimento generale elaborato da Diels ed Alder per la preparazione di cicli a 6 termini. Consiste nella reazione tra un diene coniugato e un composto contenente doppi o tripli legami (un *dienofilo*).

Come visto sopra si tratta di reazioni descritte come cicloaddizioni [4+2], ad indicare il numero di elettroni coinvolti nel processo. Generalmente le reazioni hanno luogo per semplice riscaldamento dei reagenti, come tali o in un solvente inerte, e ad una temperatura che dipende dalla struttura dei reattivi.

Sebbene la reazione di Diels-Alder tra *butadiene* ed *etilene* sia realizzabile, con rese modeste, essa risulta poco soddisfacente se non del tutto impossibile con altri alcheni o alchini semplici. Quando, però, il legame insaturo è coniugato con un gruppo ad attrazione elettronica, come un *carbonile*, un *nitro* gruppo o un *ciano* gruppo, la reazione decorre in condizioni molto blande ed in maniera soddisfacente.

Questo risultato sembrerebbe attribuibile al fatto che il sostituente contribuisce a ridurre il contenuto energetico del LUMO del *dienofilo*, restringendone il divario con quello dell'HOMO del diene, aumentando così l'interazione di legame dello stato di transizione.

Affinché la reazione avvenga, il *diene* deve poter conseguire la conformazione s-

cis, necessaria per la formazione di un ciclo. Questa condizione è sempre soddisfatta con dieni aciclici, anche se con differenze di reattività (per esempio i *cis-butadieni* 1-sostituiti sono meno reattivi degli isomeri *trans* per ragioni di ingombro sterico nella conformazione *s-cis*, che determina un aumento dell'energia di attivazione). I *dieni* ciclici reagiscono invece solo se sono di tipo *cis*.

La reattività del *diene* è accresciuta dalla presenza di sostituenti elettrondonatori, che causano, probabilmente, un aumento dell'energia dell'HOMO, rendendolo energeticamente compatibile con il LUMO del *dienofilo*. Fra i composti *eteroaromatici* monociclici il furano è il più reattivo, mentre il *tiofene*, composto aromatico più stabilizzato, è inerte.

Stereochimica :

La complementarità nell'interazione elettronica tra diene e dienofilo favorisce la regio e la stereo selettività della DA. Gli effetti strutturali e dei sostituenti possono essere esplorati nei dettagli dall'analisi computazionale dello stato di transizione (ST) e dalla sua energia. La comparazione delle relative energie, che entrano in gioco durante la formazione dello stato di transizione, permette la predizione e l'interpretazione della reazione.

La struttura dello stato di transizione, per una reazione concertata, prevede che il diene adotti una conformazione *s-cis*, in modo tale che i due reagenti si avvicinino l'un l'altro su piani paralleli; l'interazione orbitale è sopraffacciale. Ciò comporta la formazione predominante dell'isomero termodinamicamente meno stabile, l'isomero *endo*. La possibilità di un'addizione di tipo *endo* è avvalorata anche dalle interazioni secondarie degli orbitali HO e LU nello stato di transizione, interazioni che, ovviamente, non potrebbero verificarsi nell'addizione di tipo *exo*. Tali interazioni secondarie sono dovute alla sovrapposizione di orbitali di ugual fase e non si trasformano in legami, ma concorrono a stabilizzare lo stato di transizione. In genere il prodotto *exo* è termodinamicamente più stabile e a volte è possibile ottenerlo in condizioni in cui la formazione dell'addotto cineticamente favorita sia reversibile. Ne è un esempio la reazione tra *furano* e

maleimmide :

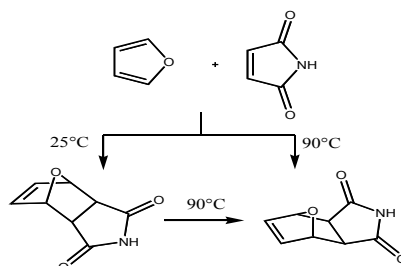


Fig. 3.13

L'isomero *endo*, meno stabile, si forma più rapidamente e predomina a bassa temperatura (es: 25°C), condizione in cui la reazione è effettivamente reversibile; ma a temperature più alte (es: 90°C) questo prodotto si trova in rapido equilibrio con i reagenti, cosicchè si va gradualmente accumulando l'isomero *exo*, che si forma più lentamente, ma che è termodinamicamente più stabile.

Infine, meritano una citazione il grado di *sincronicità* nella formazione dei legami e la natura della riorganizzazione elettronica durante lo ST.

Per dieni e dienofili simmetrici privi di sostituenti elettron-attrattori, la reazione è sincrona quando il grado di formazione dei legami tra C1-C1' e tra C4-C2' è lo stesso. Lo stato di transizione mostra *aromaticità*, dovuta alla delocalizzazione dei 6 elettroni σ , che partecipano alla riorganizzazione dei legami. Lo stato di transizione assomiglia molto al sistema σ del *benzene*.

Quando il grado di formazione dei legami tra C1-C1' e tra C4-C2' non è uguale si parlerà invece di *asincronia*. In questo caso si può avere perdita di stereospecificità, a causa della formazione di un intermedio in cui un legame si forma e l'altro no, consentendo la rotazione o l'inversione dei termini non legati. Un'ulteriore perdita di stereospecificità avviene quando è coinvolto un intermedio carico.

Applicazioni.

La reazione di Diels-Alder per versatilità e stereospecificità è di grande

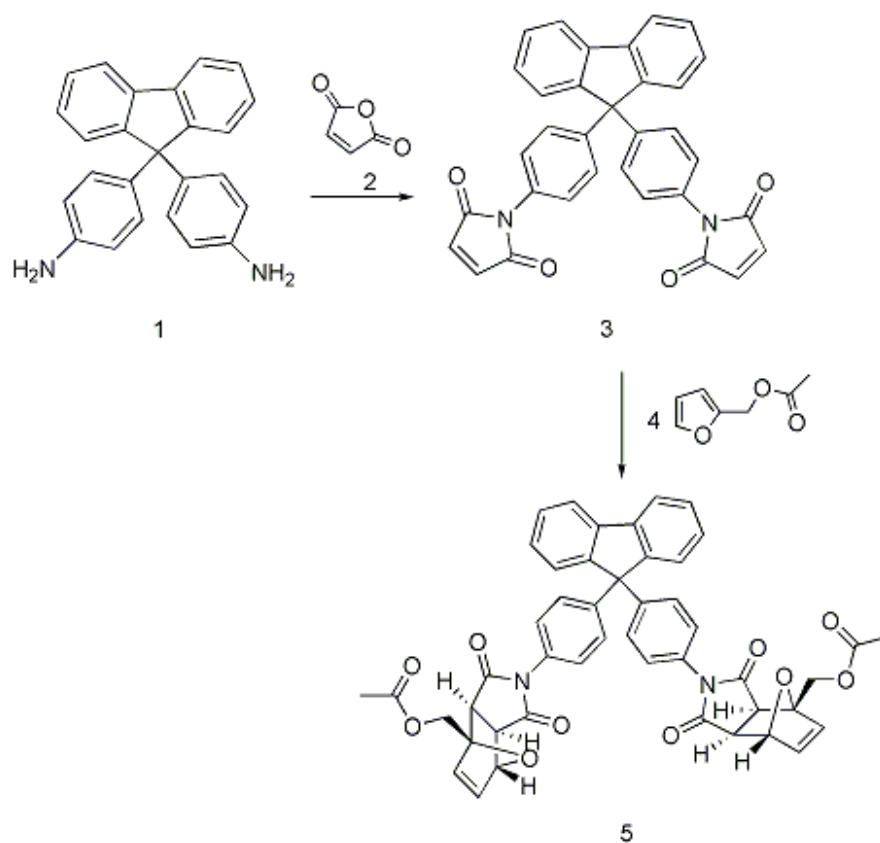
importanza per la sintesi di composti naturali. Con un'appropriata scelta degli intermedi di partenza è spesso possibile ottenere in un solo passaggio un prodotto con i diversi sostituenti nella configurazione stereochimica richiesta.

3.2 Scopo del lavoro

In questo lavoro di tesi riportiamo: a) la sintesi del *4-(4-{9-[4-(1-etossimetil-3,5-diosso-10-ossa-4-aza-triciclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-en-4-il)-fenil]-9H-fluoren-9-il}-fenil)-3,5-diosso-10-ossa-4-aza-triciclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-en-1-il etanoato di metile*, caratterizzata dalla presenza di un sistema bis-immidico derivante dal Fluorene, quale composto modello per la sintesi di polimeri autorigeneranti; b) la sintesi del polimero derivante dalla reazione dell'unità bis-immidica con il tetrakis-furano mediante reazione di Diels Alder.

3.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

Il composto modello è stato preparato come mostrato nello schema 1.



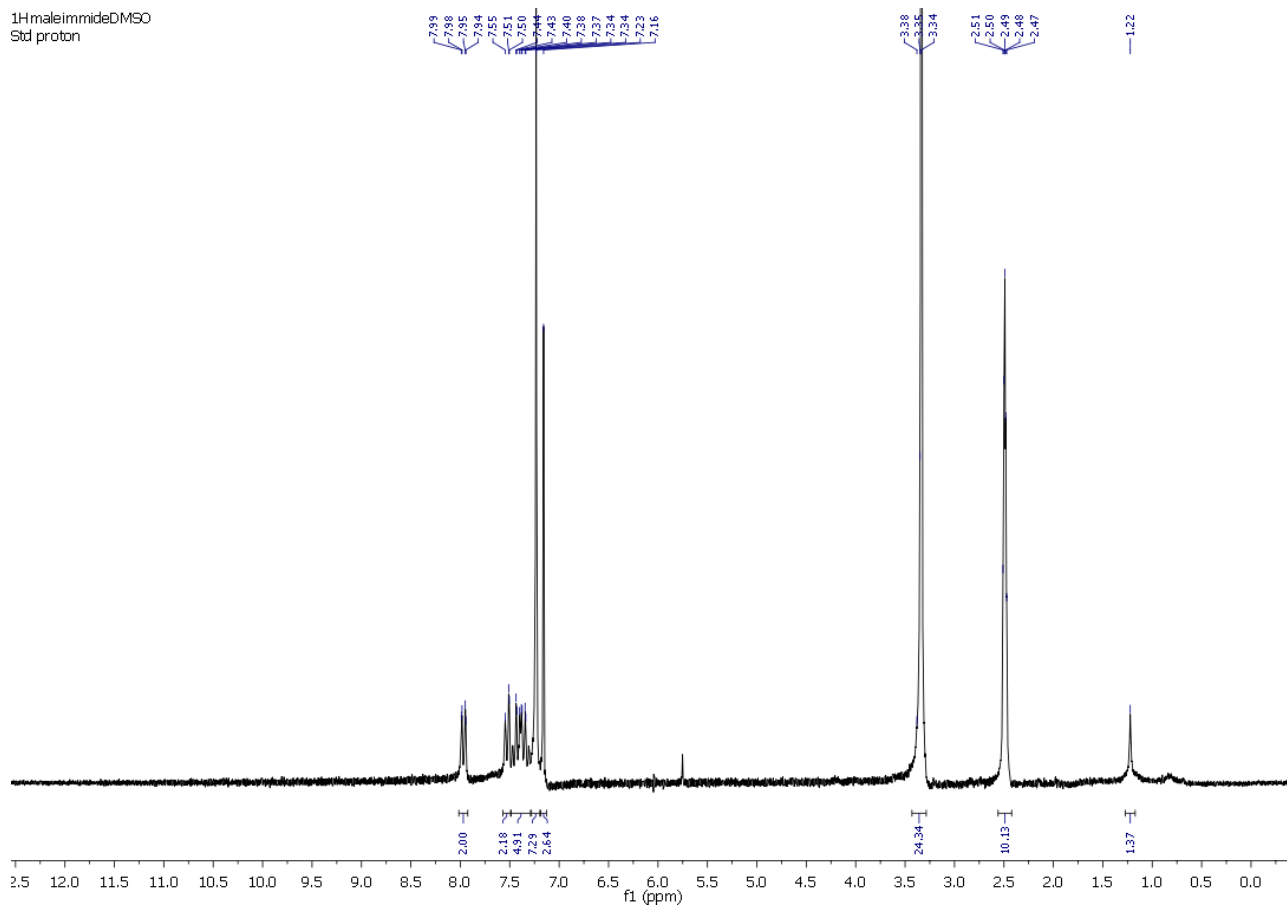
Schema 1

In particolare, la bis-maleimide **3** è stata ottenuta facendo reagire la 4,4'-(9-Fluoreniliden)dianilina **1** con l'anidride maleica **2**, con resa del 68 %. Il Cardio bismaleimide **3** è stato caratterizzato in base ai suoi dati analitici e spettroscopici. Lo spettro ^1H NMR mostra, oltre ai segnali aromatici del nucleo fluorenico, un singoletto a 7.157 ppm, dovuto agli idrogeni dei carboni coinvolti nel doppio legame carbonio carbonio dei cicli maleimmidici.

Negli spettri ^{13}C NMR sono diagnostici il segnale a 169.30 ppm inerente il carbonile immidico e quello a 134.25 ppm del CH alchenilico.

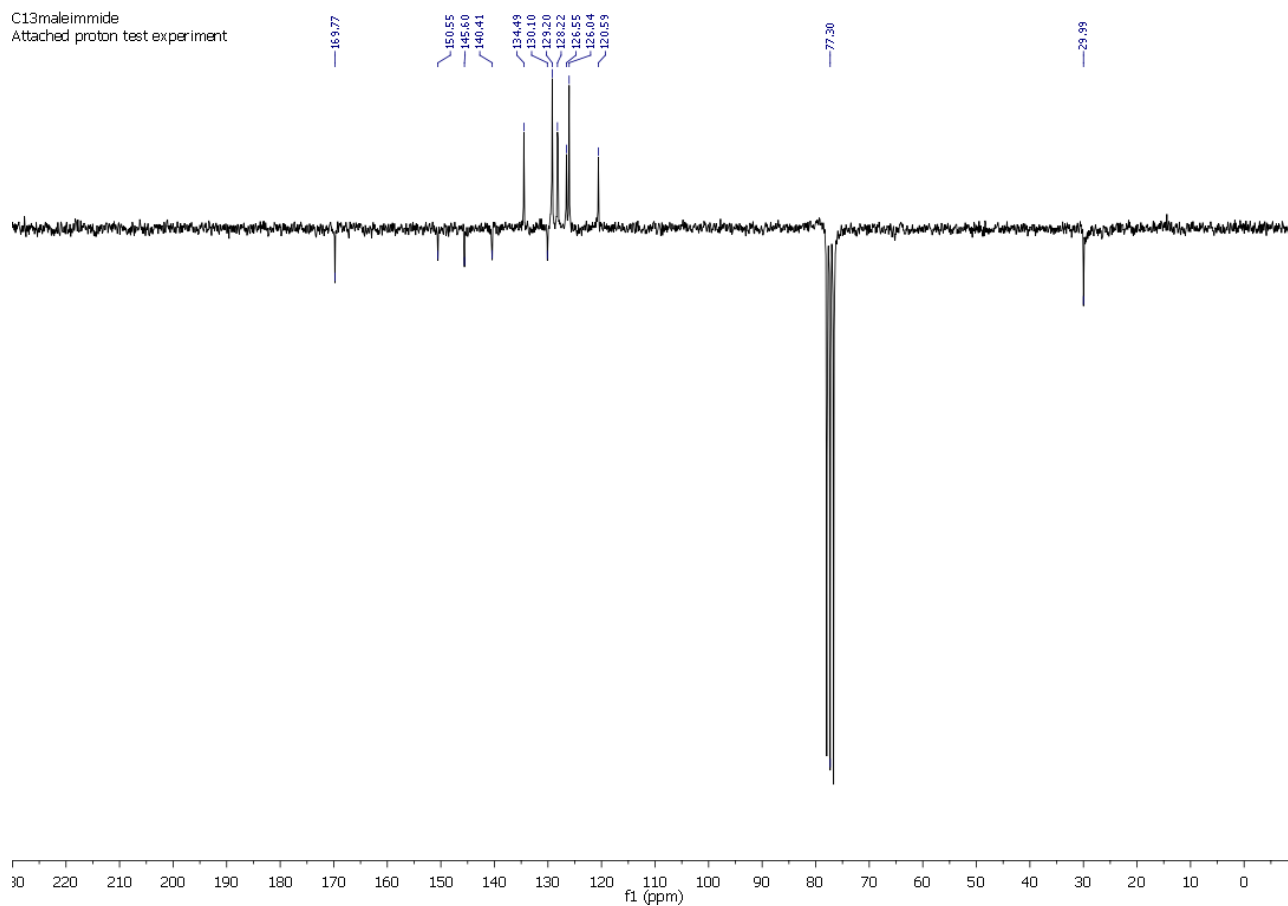
Spettro ^1H NMR del composto 3

^1H maleimideDMSO
Std proton



Spettro ^{13}C NMR del composto **3**

C13maleimide
Attached proton test experiment



Successivamente, la bis-maleimmide **3** viene fatta reagire con acetato di furfurile **4** (16 eq) conducendo la reazione al microonde, in fiala chiusa, in assenza di ossigeno. Sebbene tale reazione proceda anche per riscaldamento in fiala chiusa a 76 °C, l'uso del microonde riduce notevolmente i tempi di reazione (20–30 min contro 4-6 giorni) migliorando, nel contempo, le rese (10-15%).

La formazione dei tre addotti di tipo *cis-cis*, *trans-trans* e *cis-trans*, è dovuta, rispettivamente, alle due possibili modalità di attacco *endo/eso* del dienofilo.

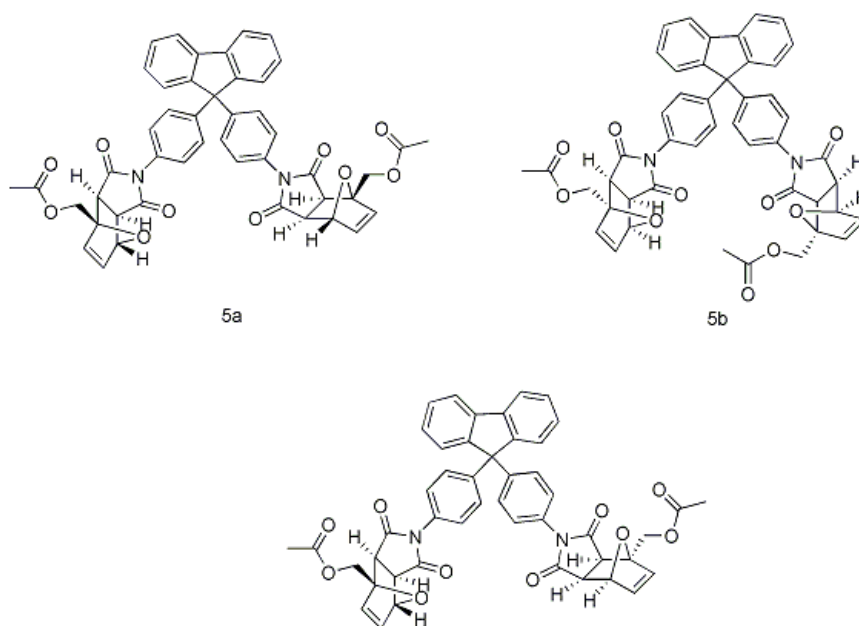
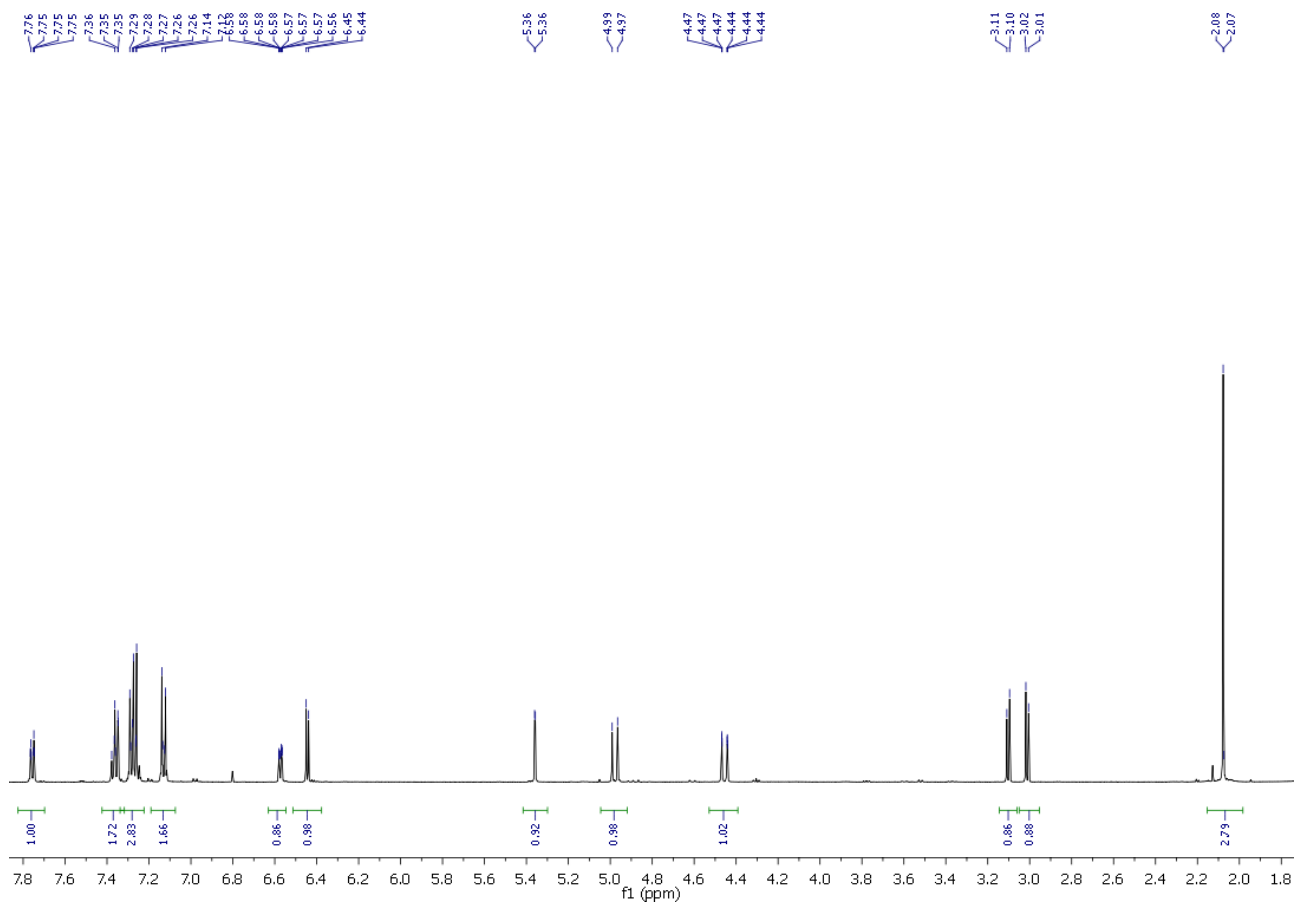


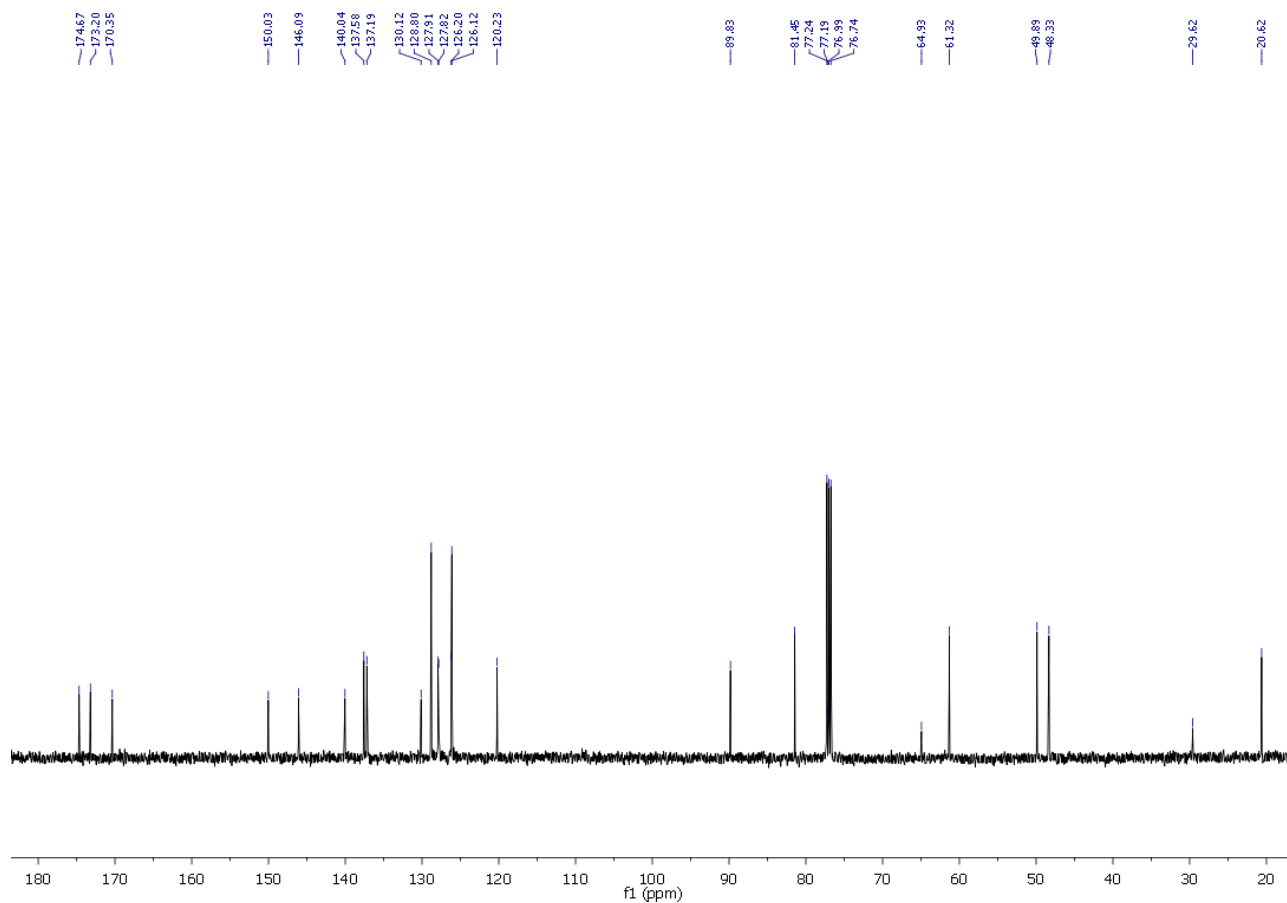
Figura
1

La struttura molecolare dei prodotti di reazione è stata assegnata sulla base dei dati analitici e spettroscopici.

Spettro ^1H NMR del composto **5a**

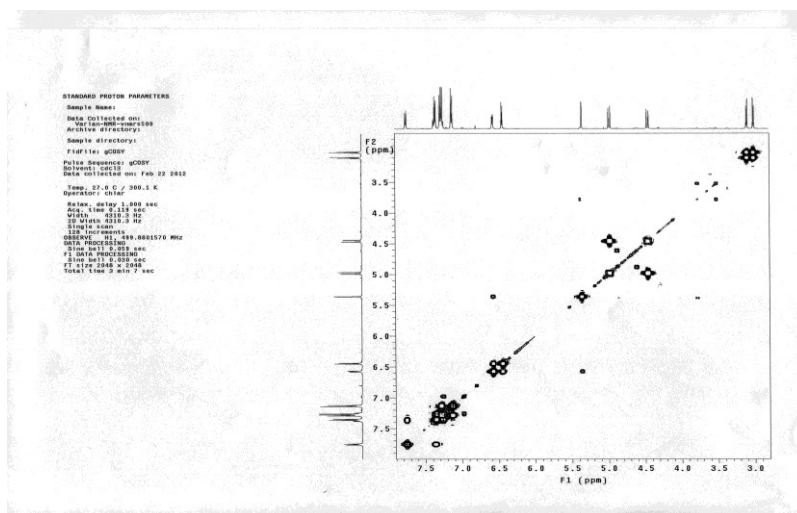
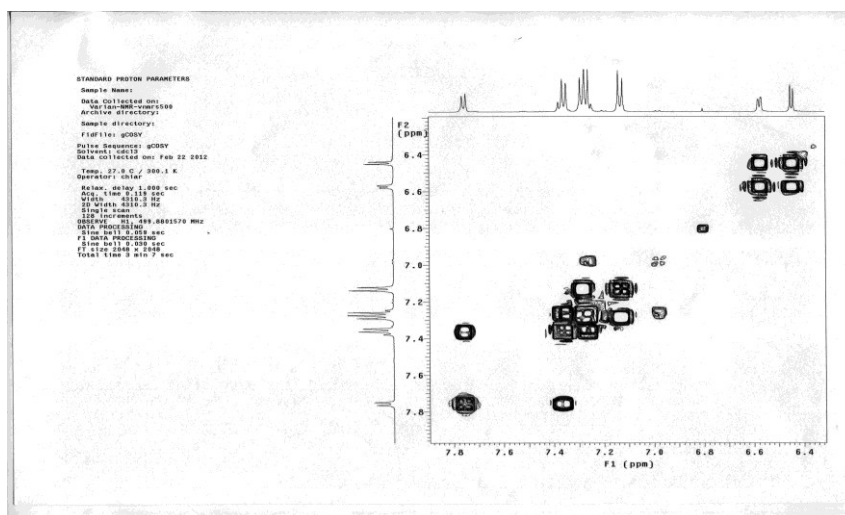


Spettro ^{13}C NMR del composto **5a**

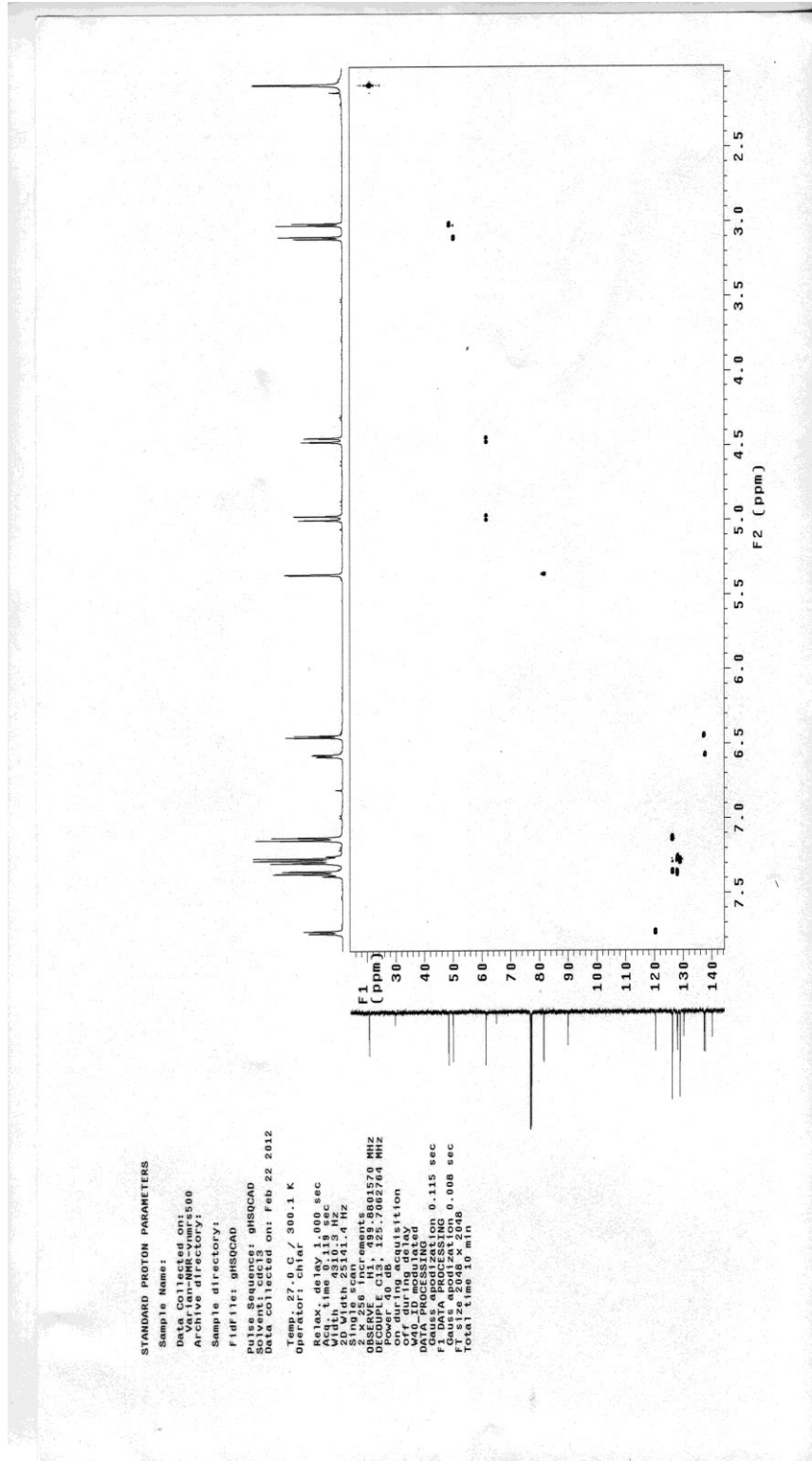


I segnali di tutti i protoni sono stati correttamente assegnati con l'ausilio dei dati di spettroscopia bidimensionale omonucleare (COSY). Purtroppo, la reazione periciclica ha mostrato un basso livello di stereoselettività *cis/trans*; infatti, l'isomero *cis* predomina del 30 % .

Spettro gCOSY del composto **5a**



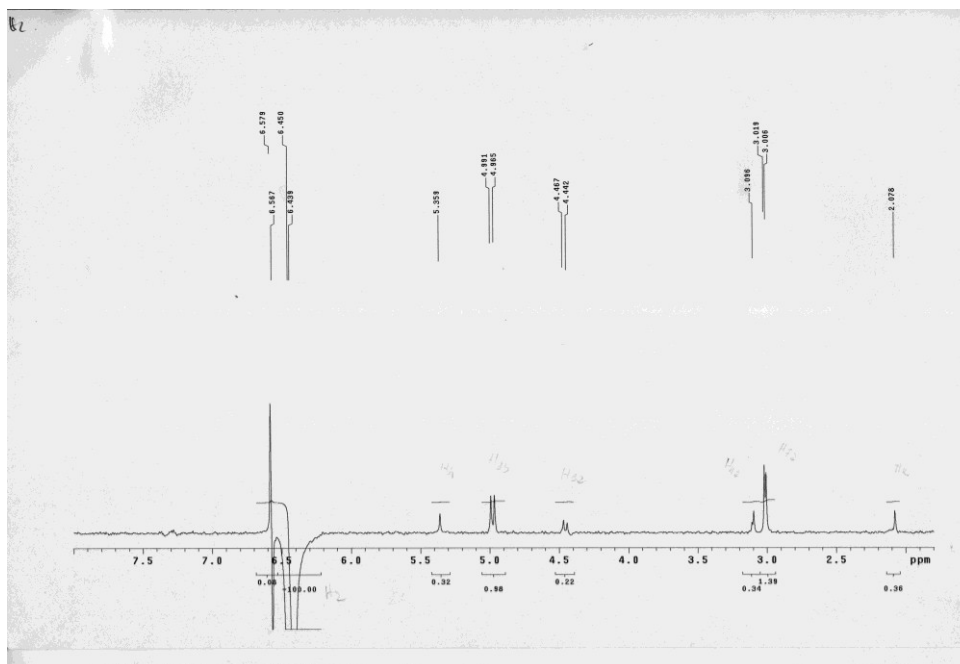
Spettro gHSQCAD del composto 5a

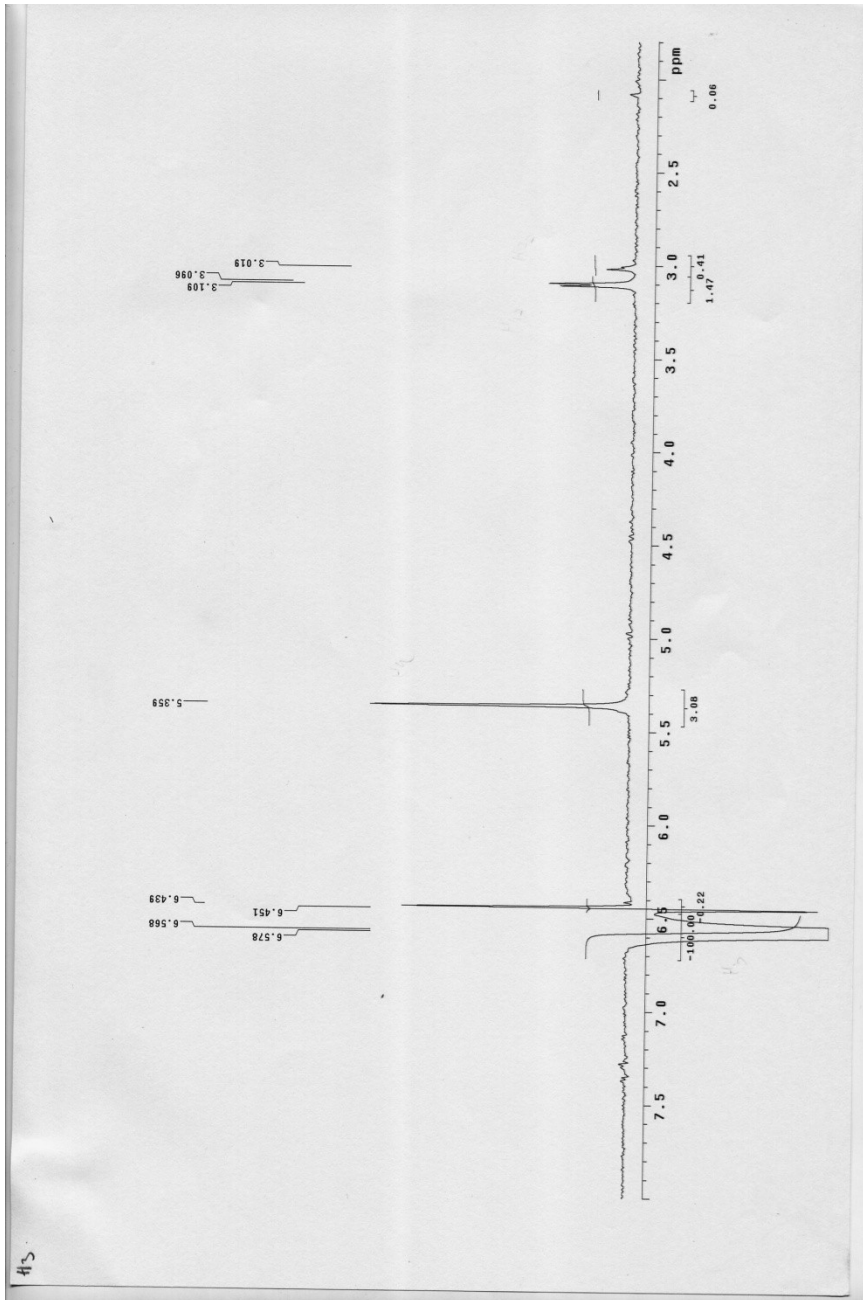


L'assegnazione della stereochimica relativa è stata ricavata dall'analisi degli spettri di differenza NOE. In particolare, per il composto **5a** l'irraggiamento di H₃, a 6.57 ppm, produce un NOE positivo del 3.08% con il protone H₄ centrato a 5.36 ppm e del 1.47 % con il protone H_{4a}; l'irraggiamento del segnale a 6.45 ppm, dovuto ad H₂, produce un innalzamento dello 0.98 % della risonanza di H_{1b}, dell' 1.39 % per H_{4a} ; il segnale a 5.36 ppm di H₄ produce effetto NOE positivo con il protone H₃ a 6.58 del 2.44% e con H_{4a} del 2.61 %; l'irraggiamento del segnale a 3.11 ppm, dovuto ad H_{4a}, produce un innalzamento del 2.41 % della risonanza di H_{7a}, del 3.15 % per H₄ e dell' 1.30% per H₂; al contrario quando viene irradiato il segnale a 3.02 ppm ossia H_{7a} si produce effetto Noe positivo sia su H_{1b} sia su H_{4a} e H₂ rispettivamente dell' 1.08%, dell'1.30% e dell'1.49%. Quando viene irradiato il protone H_{1b} si produce una discreta risposta NOE su H₂ ed H_{7a} rispettivamente del 2.53% e del 2.71%, mentre sul segnale del protone H_{1a} la risposta Noe è del 40.36%. Al contrario quando viene irradiato il protone H_{1a} si rileva solo un assorbimento per il protone H_{1b} del 30.63%.

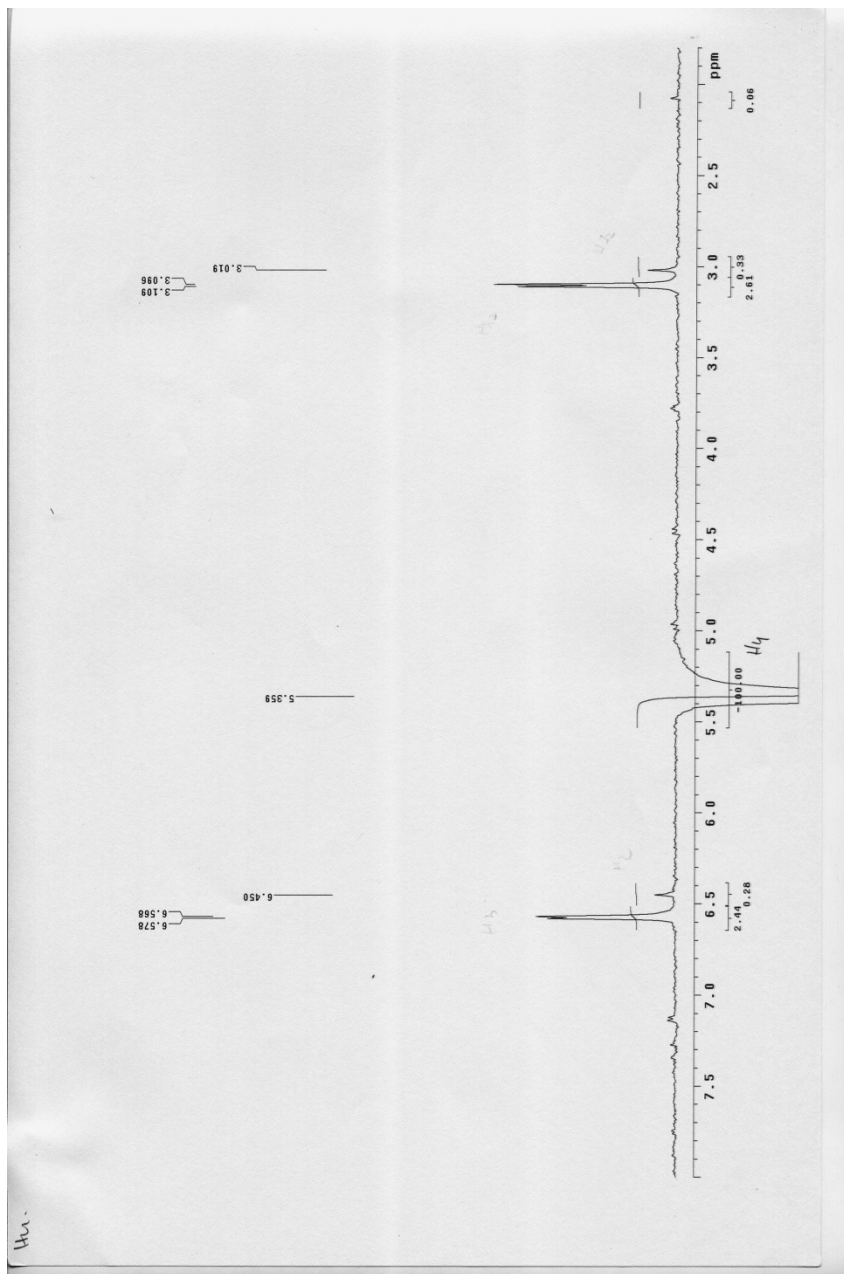
Questi dati sono perfettamente in accordo con una disposizione stereotopica in *trans* dei protoni H_{7a} ed H₄.

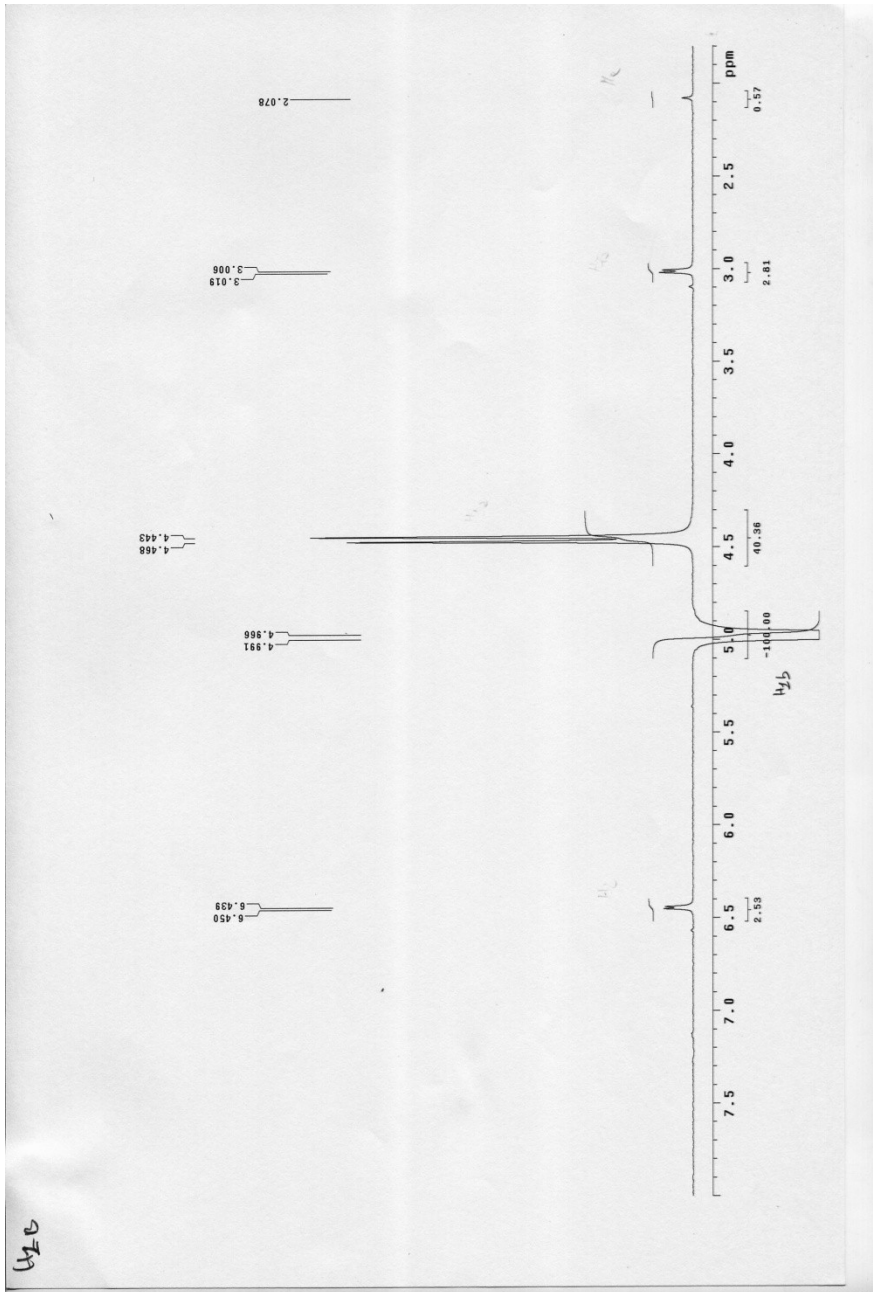
Spettri NOE del composto **5a**





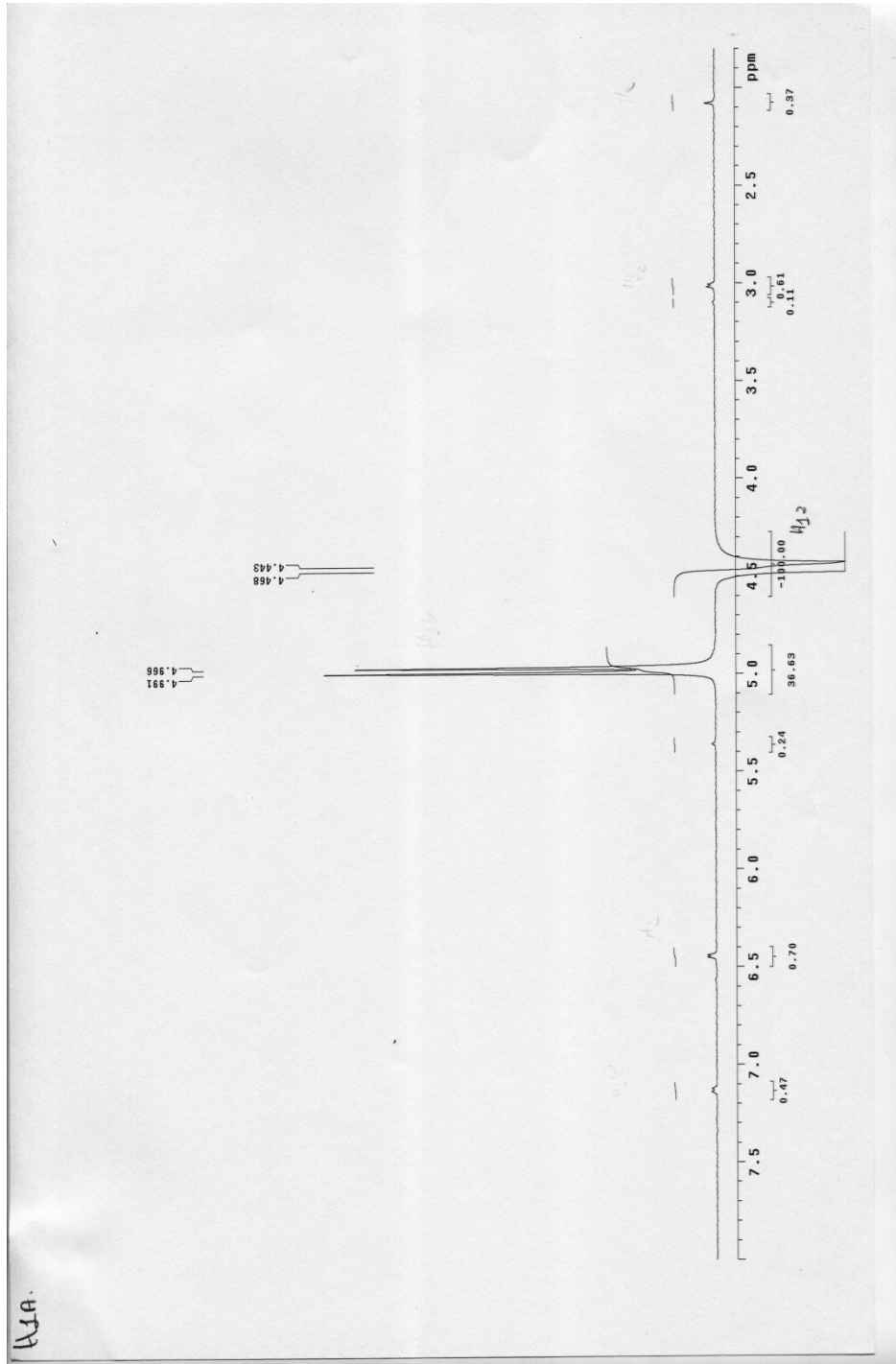
45

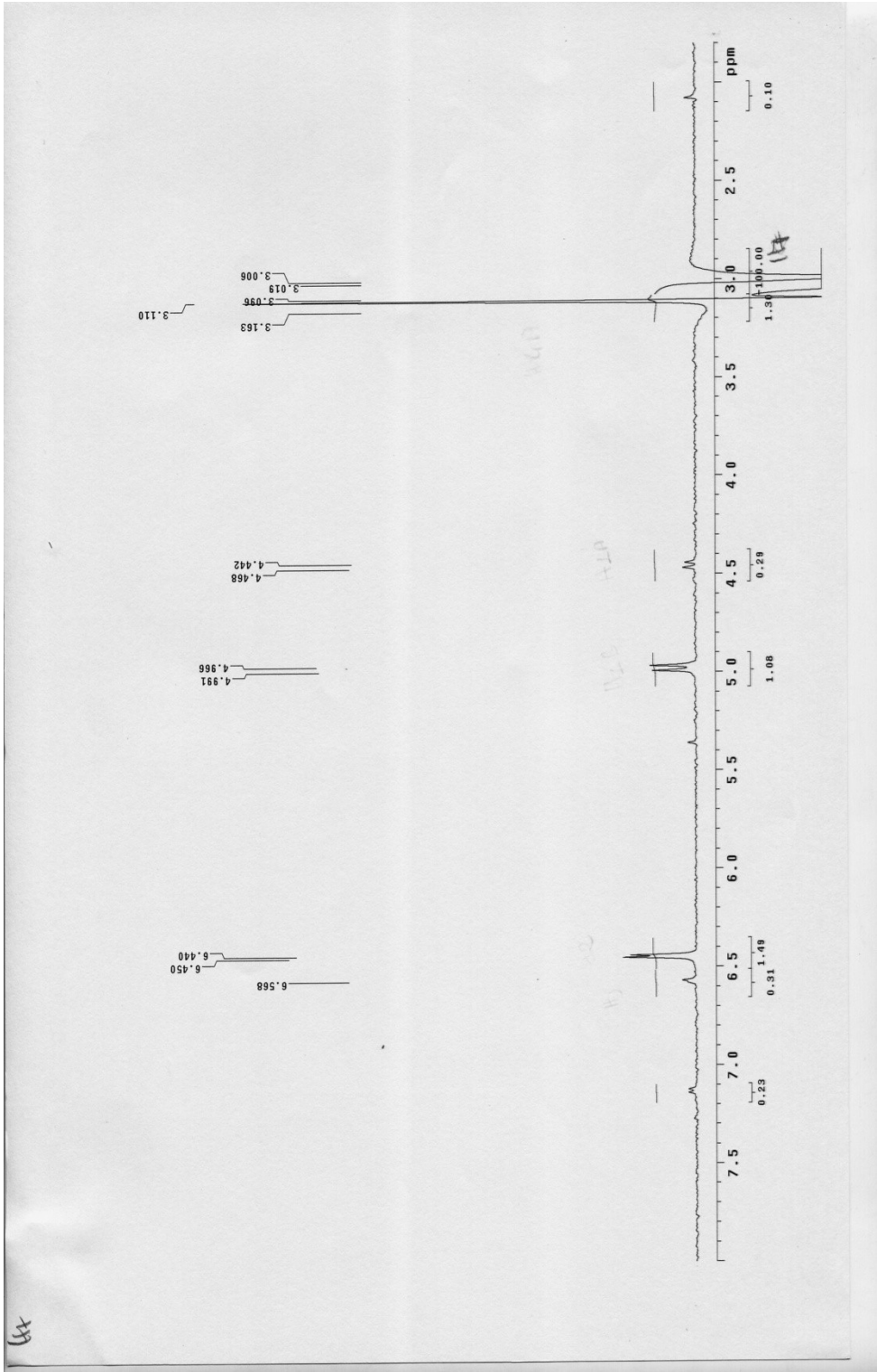


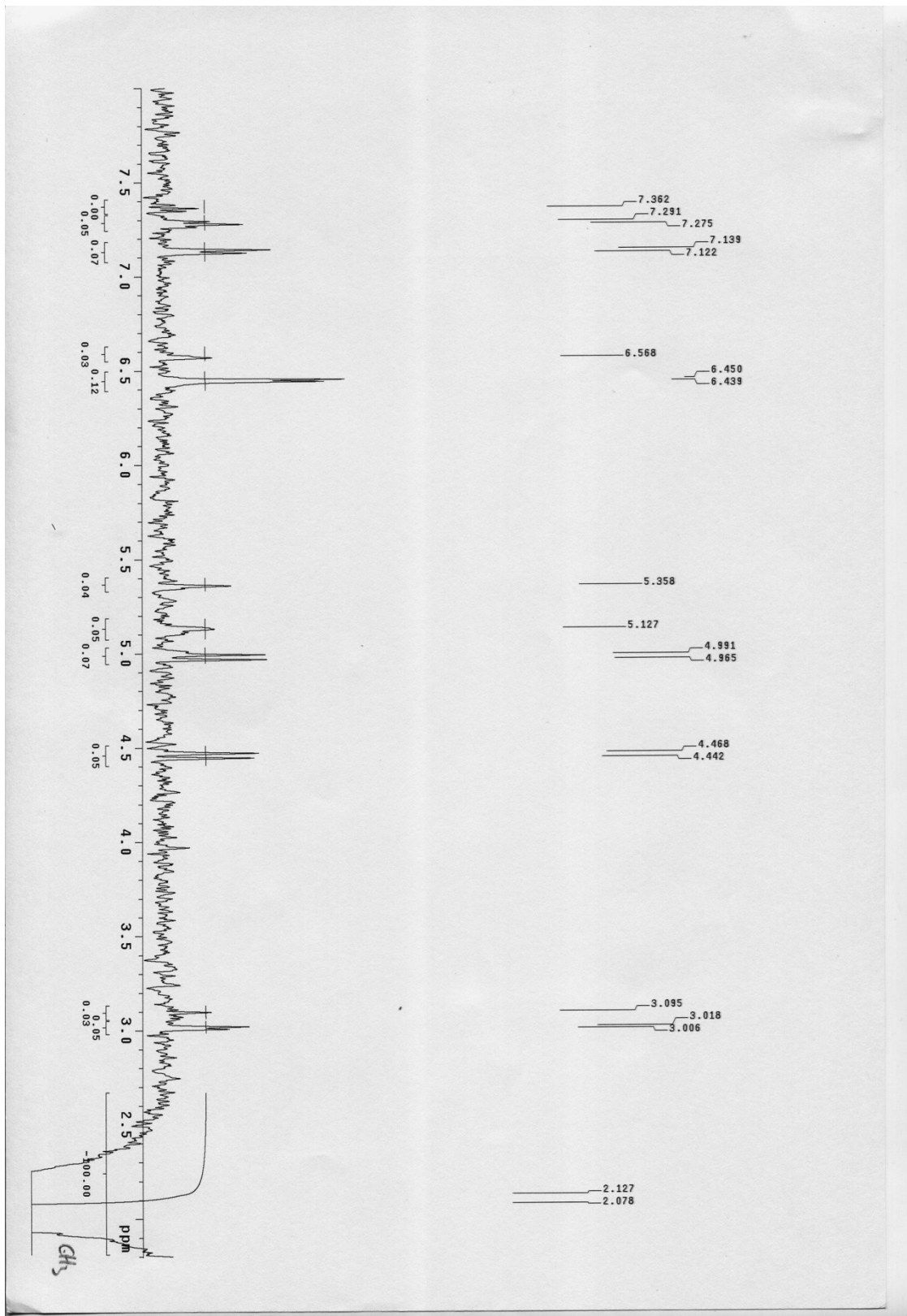


475

UJA.

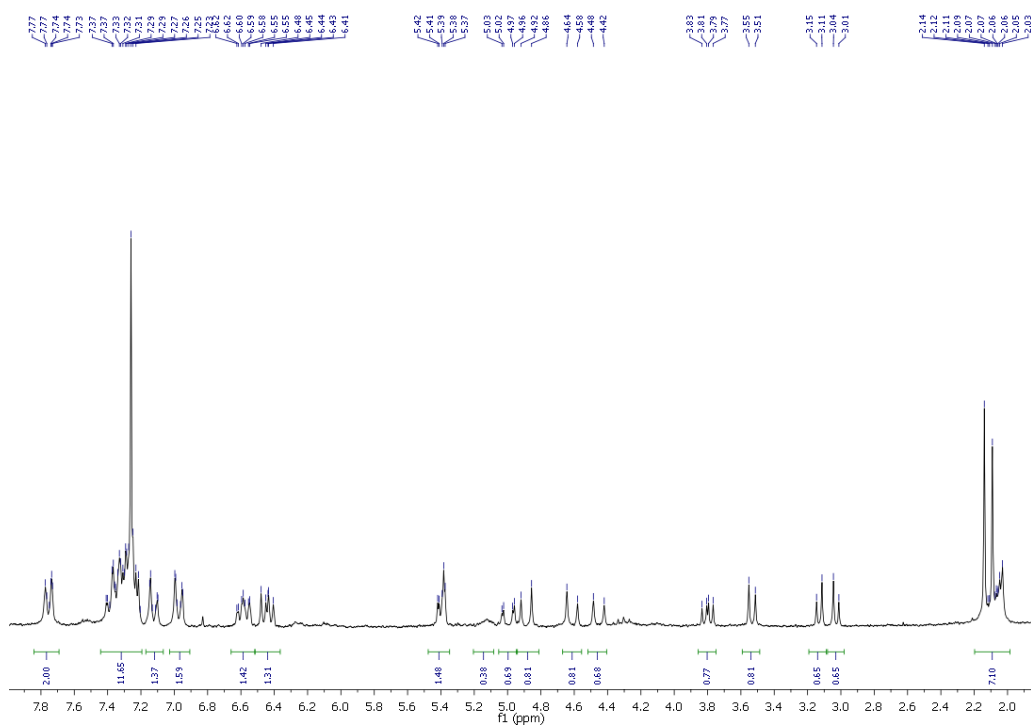




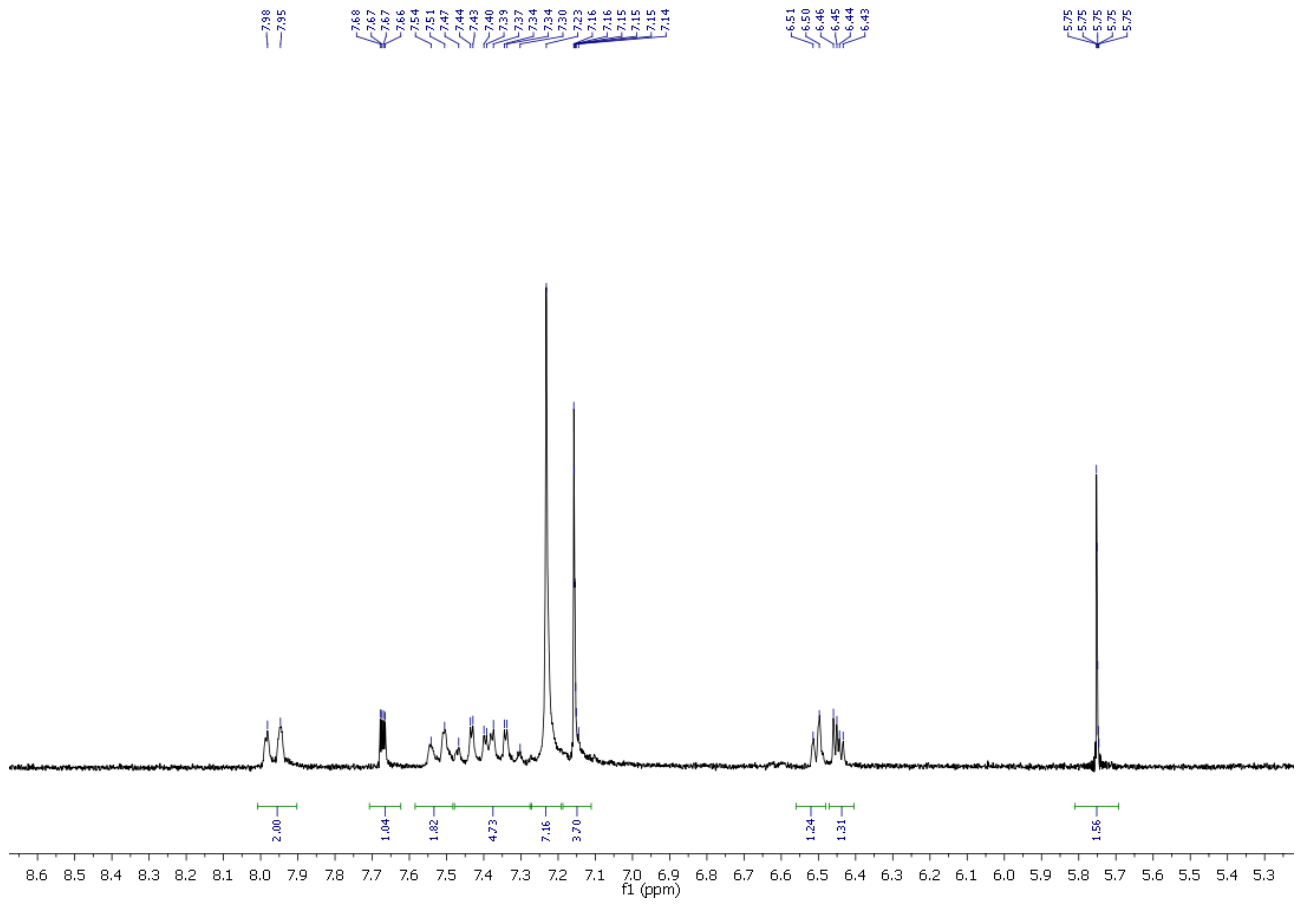


Per verificare la reversibilità del sistema, la miscela dei composti **5b** e **5c** è stata solubilizzata in DMSO deuterato e sottoposta ad elevate temperature (110°C) per 20 minuti. Per evitare la DA durante la fase di raffreddamento, il sistema è stato portato rapidamente a 0°C. Ha confermato la reversibilità del processo DA-retro DA.

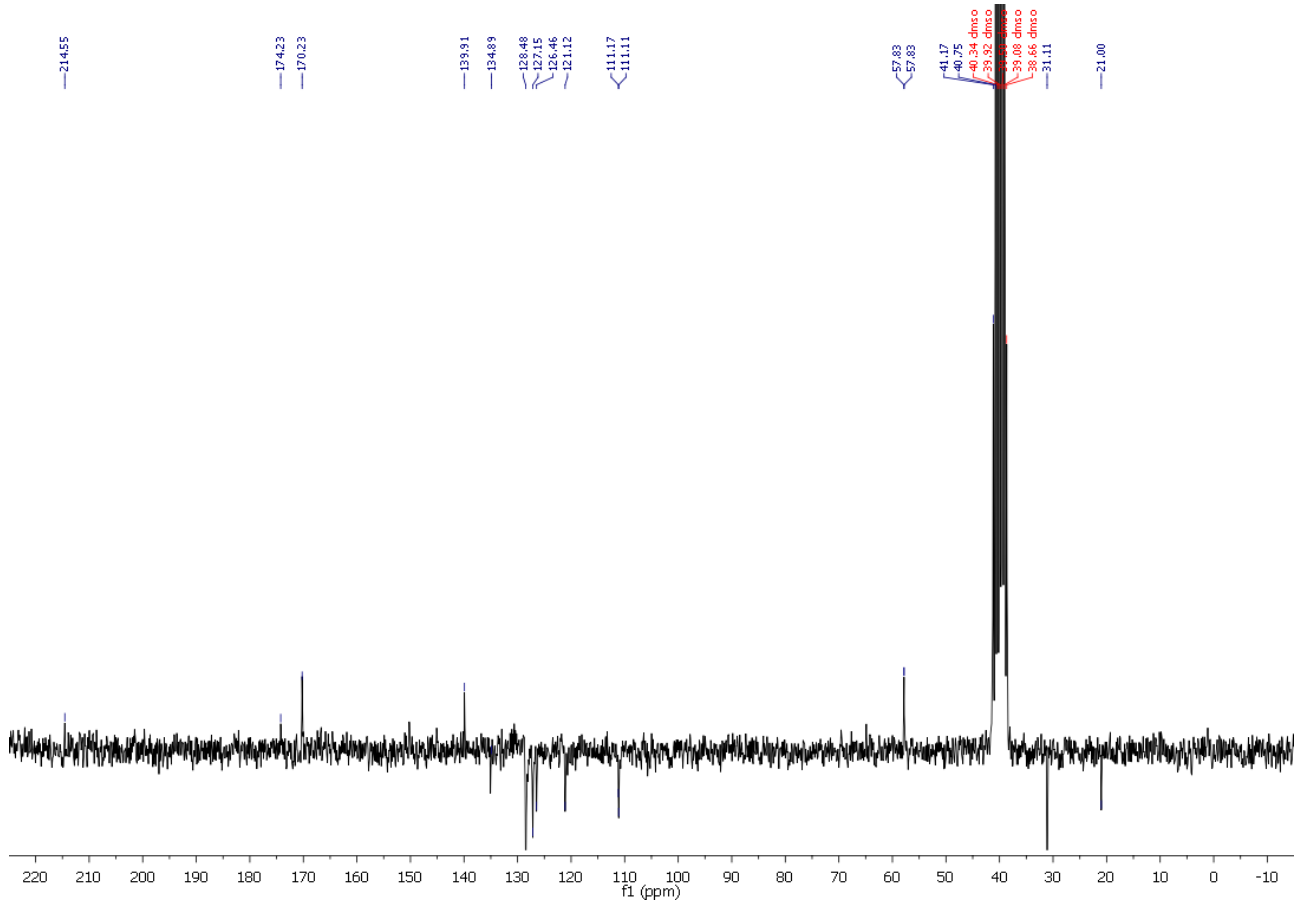
Spettro 1H NMR 5b-5c



Spettro 1H miscela Retro DA



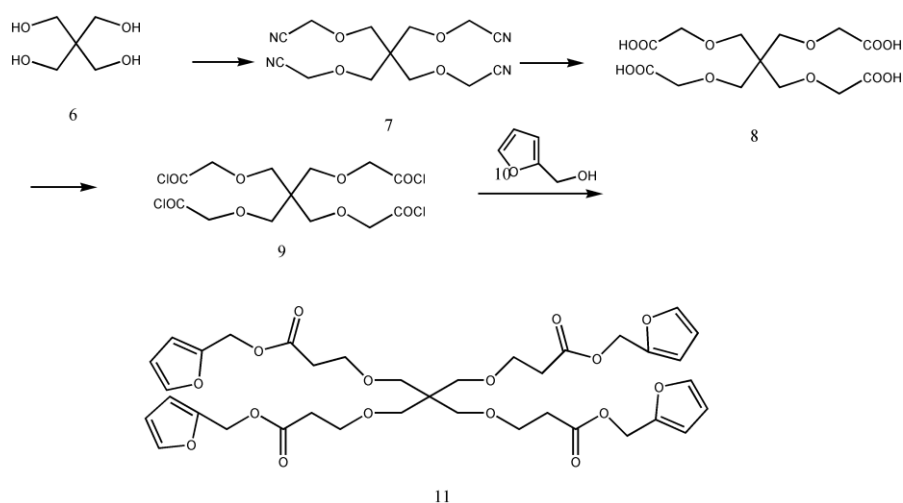
Spettro C13 miscela Retro DA



Allo scopo di ottenere polimeri autorigeneranti sul modello del composto **5a**, abbiamo effettuato la sintesi del tetrakisfurano **11** (diene elettronricco) di cui riporto i dati spettrali ed il metodo di preparazione.

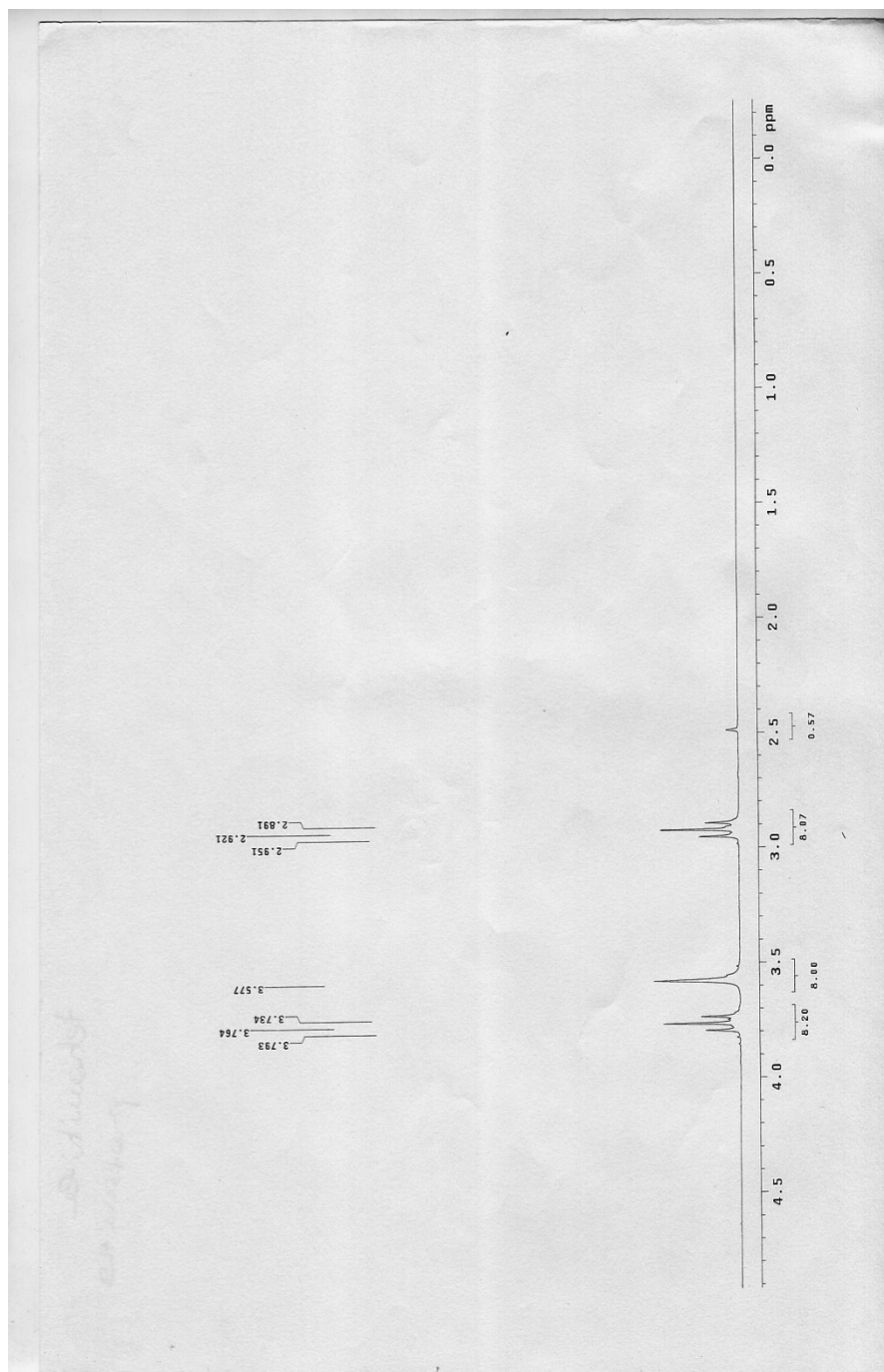
Il sistema polifuranico è stato ottenuto secondo le modalità indicate nello schema 2

Schema 2

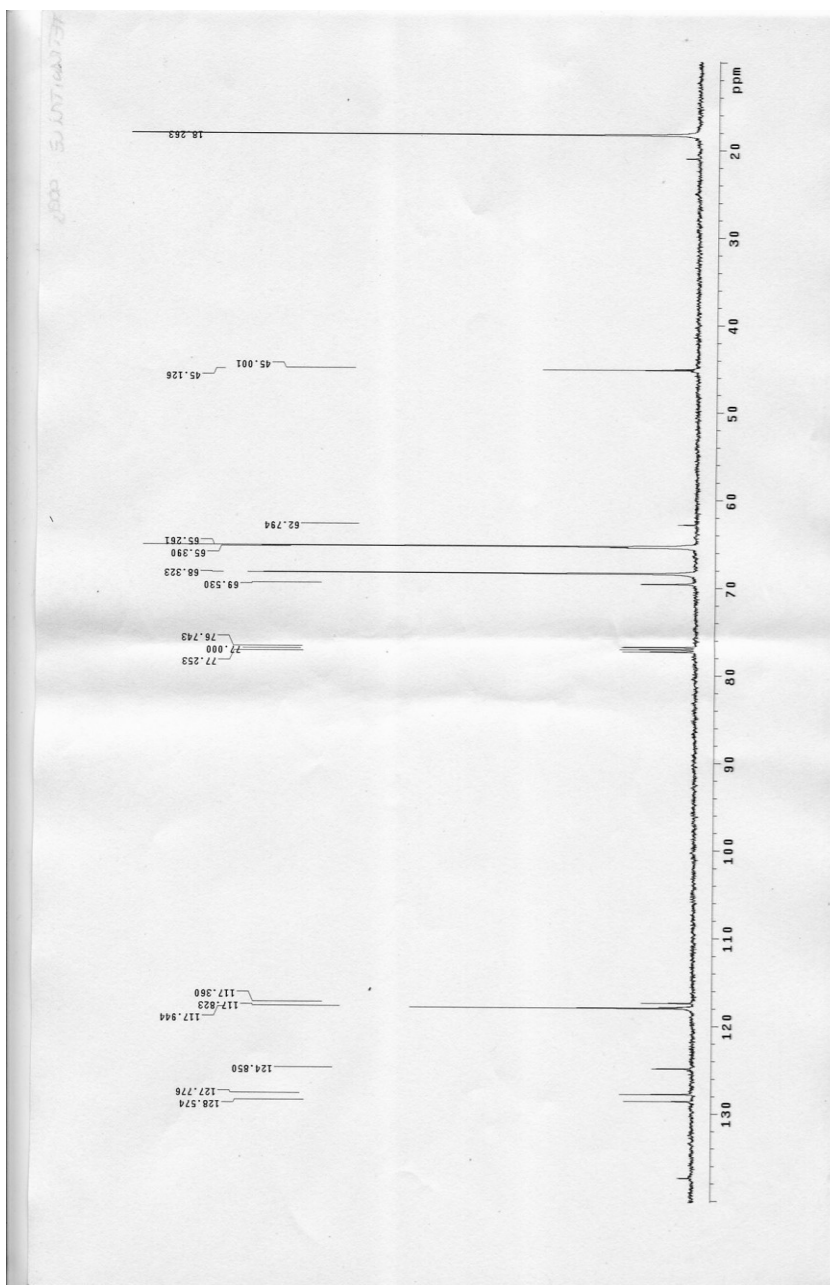


Tutte le molecole sono state caratterizzate in base ai loro dati analitici e spettroscopici:

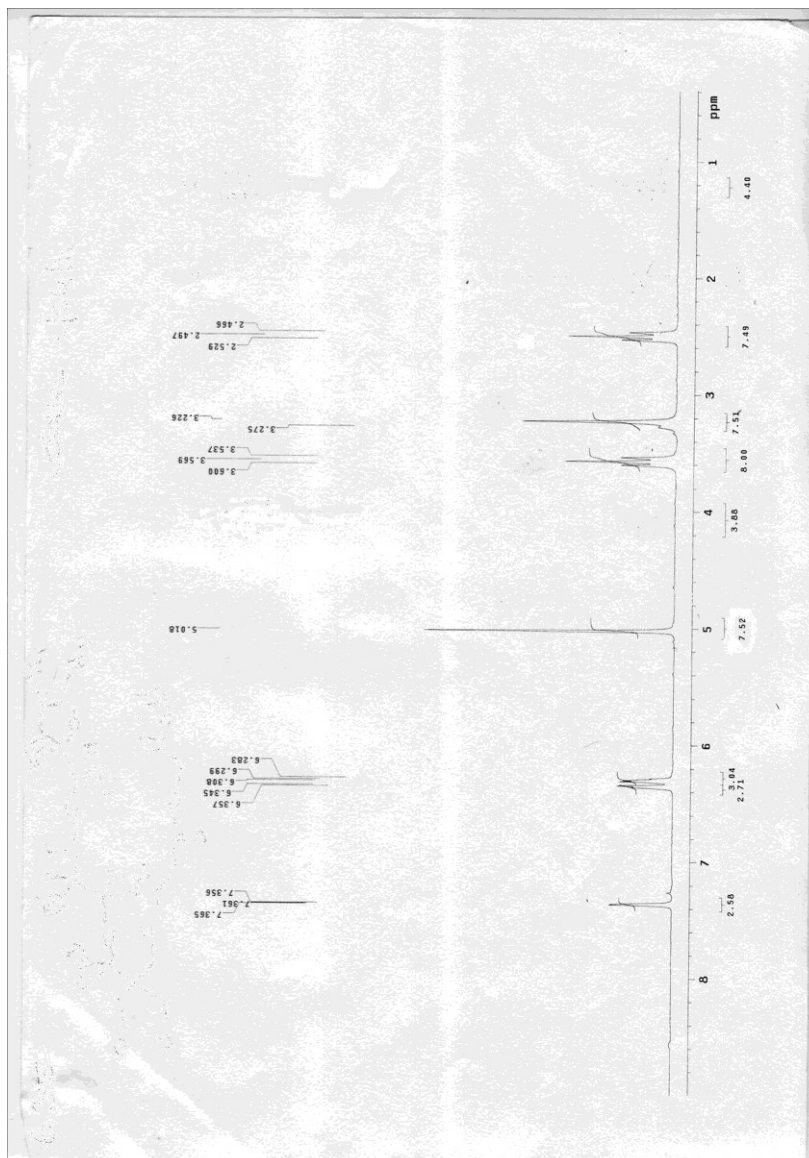
Spettro ^1H NMR del composto 7



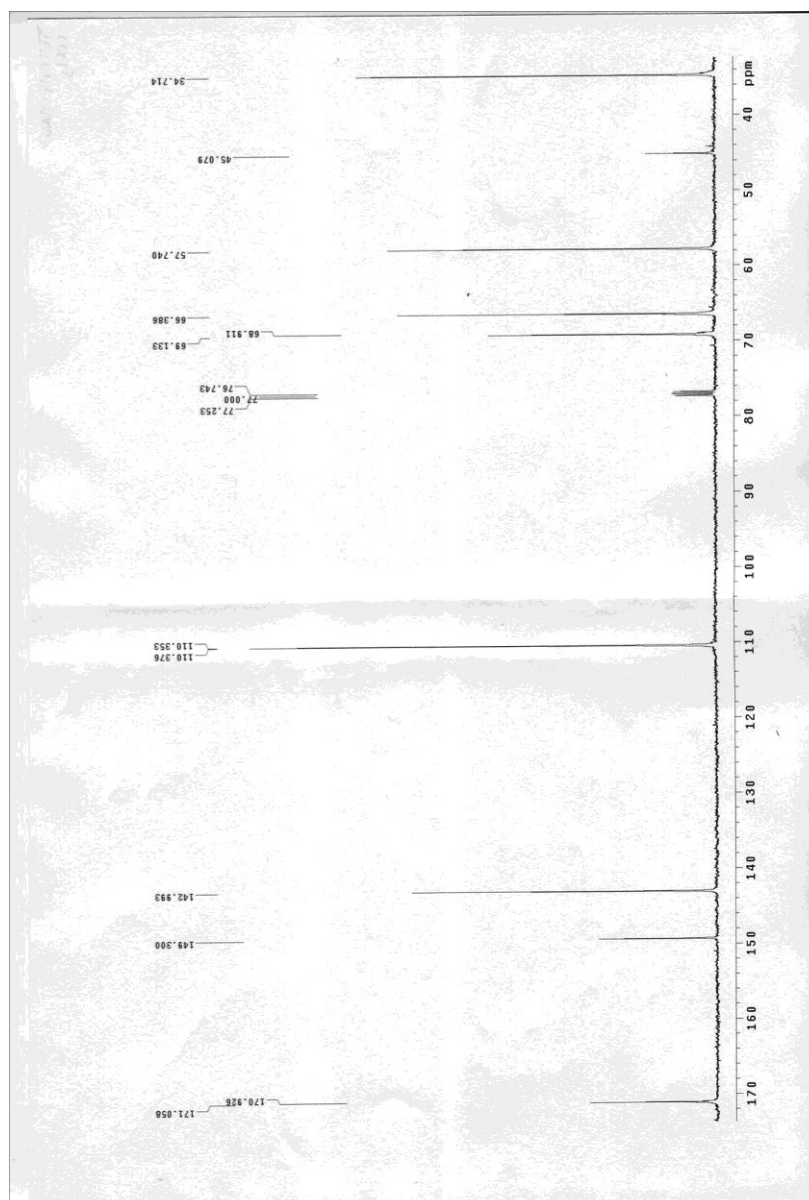
Spettro ^{13}C NMR del composto 7



Spettro ^1H NMR del composto **11**



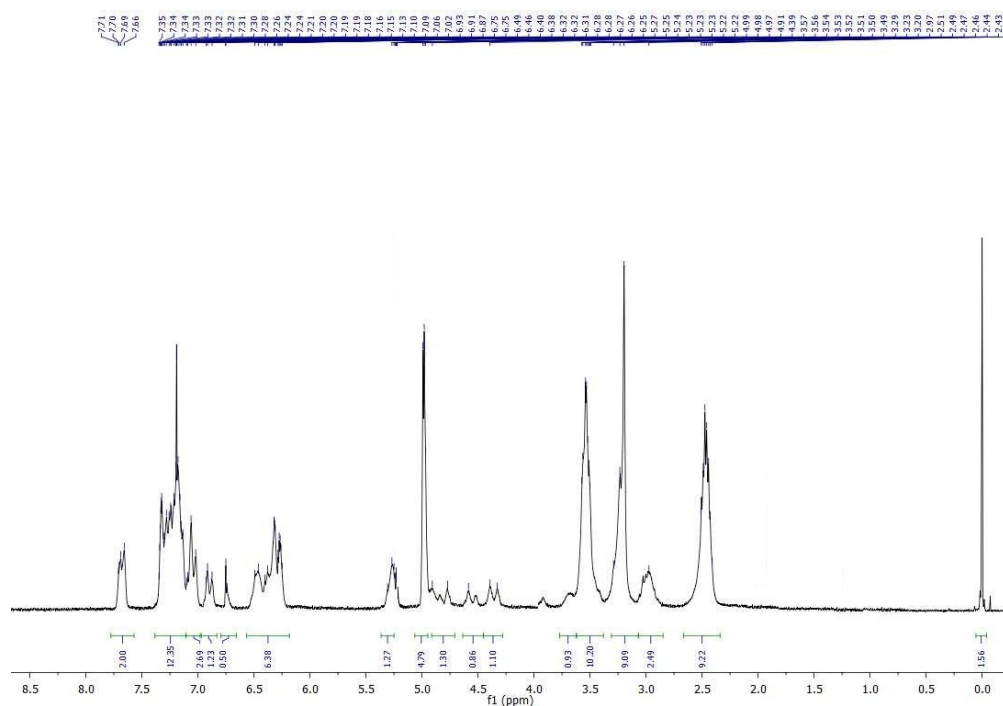
Spettro ^{13}C NMR del composto **11**



Le condizioni di reazione che ci hanno permesso di ottenere il composto modello **5c** e quelle relative alla retro Diels Alder sono state in un secondo momento meglio analizzate per permetterci di ottenere sistemi a più elevato peso molecolare. A tal proposito, il protocollo è stato adattato alle molecole multifunzionalizzate da noi sintetizzate: il tetrakis-furano **11** e il cardo Bis-maleimmide **3**.

Il polimero ottenuto è stato caratterizzato in base ai suoi dati spettroscopici:

Spettro ^1H NMR del polimero



Questo spettro protonico, se messo a confronto con gli spettri dei monomeri di partenza ci permette di rilevare: la quasi assenza del segnale immidico a 6.71 ppm, la comparsa di segnali degli addotti di Diels Alder nella zona tra 4.33-4.57 ppm e a 6.82 ppm. I segnali del tetrakis-furano e

del sistema fluorenico risultano slargati e poco definiti, indice della presenza di molte unità ripetute con intorni chimici simili.

3.4 Parte sperimentale

Procedure generali. I punti di fusione non sono stati corretti. Gli spettri NMR sono stati registrati su uno spettrometro Varian UNITY Inova operante a 500 MHz per il protone ed a 125 MHz per il carbonio 13 e sono stati riportati in ppm rispetto al TMS. La cromatografia su strato sottile è stata fatta con lastre Merck 60 F₂₅₄. Per la cromatografia su colonna abbiamo usato il gel di silice della Macherey-Nagel 60 M (0.040-0.063 mm). Tutte le reazioni che coinvolgono agenti sensibili all'aria, sono state condotte sotto atmosfera d'azoto. Tutti i reagenti sono stati acquistati dall'Aldrich o dalla TCI europe e sono stati utilizzati senza ulteriore purificazione. I solventi per cromatografia sono stati distillati sotto pressione atmosferica prima di essere utilizzati ed anidrificati con le procedure standard.

SINTESI DEL 9,9-BIS (4-MALEIMMIDOFENIL) FLUORENE (3)

Procedura generale. Ad una soluzione di anidride maleica (1.1 eq) in acido acetico (20 eq) si aggiunge alla temperatura di 0 °C il 9,9-BIS (4-AMMINOFENIL) FLUORENE (1.5 eq). La reazione procede per un'ora sempre a 0 °C, per poi continuare a riflusso per tutta la notte. La miscela di reazione è portata a temperatura ambiente ed evaporata a pressione ridotta per dare un solido giallo, ancora contaminato dall'acido acetico. Il residuo è ripreso con diclorometano e portato a secco a pressione ridotta. Questo è successivamente purificato mediante flash-cromatografia (miscela eluente diclorometano).

9,9-bis (4-maleimmidofenil) fluorene (3). Resa 70 %, solido giallo chiaro: ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 200 Mhz) δ: 7.95 (s, 2H, H₂), 7.55-7.50 (d, 2H, H₅), 7.47-7.40 (m, 4H, H₃ e H₄), 7.23 (s, 8H, H₉ e H₁₀), 7.16 (s, 4H,

H13). ^{13}C NMR (50 MHz, *DMSO-d6*) δ 169.47, 150.25, 145.30, 140.11, 134.20, 129.80, 128.91, 127.93, 127.84, 126.25, 125.74, 120.29, 77.32, 76.71.

SINTESI DEL COMPOSTO MODELLO 5

Procedura generale. Alla bis-meleimmide **3** (1 eq.) solubilizzata in diclorometano si aggiungono 0.1 mL di furfuril acetato (4 eq.). La reazione è condotta in fiala chiusa al microonde alla temperatura di 80 °C per 30 min. La miscela di reazione è evaporata a pressione ridotta ed il prodotto ottenuto è purificato tramite flash-cromatografia.

4-(4-{9-[4-(1-etossimetil-3,5-diosso-10-ossa-4-aza-triciclo [5.2.1.0^{2,6}]dec-8-en-4-il)-fenil]-9H-fluoren-9-il}-fenil)-3,5-diosso-10-ossa-4-aza-triciclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-en-1-iletanoato di metile. (5a) Purificazione tramite flash cromatografia (acetato di etile\cicloesano 20%). Resa 56%, solido marrone: ^1H NMR (200 MHz, *CDCl*₃) δ 7.76 (dd, $J = 8.0, 1.4$ Hz, 2H), 7.48 – 6.91 (m, 12H), 6.69 – 6.36 (m, 4H), 5.38 (d, $J = 1.7$ Hz, 2H), 5.19 – 4.81 (m, 2H), 4.45 (d, $J = 12.9$ Hz, 2H), 3.22 – 2.96 (m, 4H), 2.36 – 1.94 (s, 6H).

^{13}C NMR (126 MHz, *CDCl*₃) δ 174.93, 173.46, 170.62, 150.29, 146.35, 140.31, 137.84, 137.45, 130.39, 129.06, 128.18, 128.09, 126.46, 126.39, 120.49, 90.09, 81.71, 77.51, 77.45, 77.25, 77.00, 65.20, 61.59, 50.15, 48.59, 29.89, 20.89.

4-(4-{9-[4-(1-etossimetil-3,5-diosso-10-ossa-4-aza-

tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-en-4-il)-fenil]-9H-fluoren-9-il}-fenil)-3,5-diosso-10-ossa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-en-1-iletanoato di metile. (5b,5c)

Resa 20%, solido marrone: ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ 7.83 – 7.70 (m, 2H), 7.49 – 7.18 (m, 12H), 7.17 – 7.06 (m, 2H), 6.97 (dd, *J* = 8.7, 1.1 Hz, 2H), 6.68 – 6.51 (m, 2H), 6.44 (dd, *J* = 9.0, 5.7 Hz, 2H), 5.46 – 5.33 (m, 2H), 5.04 – 4.83 (m, 2H), 4.61 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 4.45 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H), 3.78 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 3.53 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 3.13 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 3.03 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 2.20 – 1.97 (m, 7H).

PROCEDURA PER LA RETRO DIELS ALDER

Procedura generale. La miscela dei composti 5b e 5c solubilizzata in DMSO-d₆ viene portata alla temperatura di 110°C. Dopo 20 minuti il sistema viene rapidamente portato alla temperatura di 0°C. Lo spettro NMR rileva la presenza dei substrati 3 e 4. Resa 100%; ¹H NMR (DMSO-d₆ 200 MHz) δ 7.96 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.67 (dd, *J* = 1.8, 0.9 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.48 – 7.27 (m, 5H), 7.23 (s, 7H), 7.19 – 7.11 (m, 4H), 6.51 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 6.45 (dd, *J* = 3.3, 1.9 Hz, 1H), 5.81 – 5.69 (m, 2H). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆) δ 170.24, 170.23, 139.92, 139.91, 135.07, 128.48, 127.15, 126.46, 121.12, 111.11, 57.83, 57.83, 41.17, 40.75, 40.34, 39.92, 39.50, 39.08, 38.66, 31.11, 21.00.

SINTESI DEL 5,5-BIS(4-CIANO-2-OSSABUTIL)-1,9-DICIANO 3,7-DIOSSANONANO (7)

Il Pentaeritritolo (150 g, 1.10 mol.) e 120 ml di una soluzione acquosa al 40% di KOH vengono addizionati a 525 ml di toluene. A questa miscela viene aggiunto goccia a goccia l'acrilonitrile (953.4 g 17,6 mol). La miscela risultante viene lasciata agitare a temperatura ambiente per 3h. Trascorso questo tempo vengono aggiunti 975 ml di toluene e 1200 ml di una

soluzione acquosa al 5% di NaCl. La fase organica viene lavata 2 volte con la soluzione satura di NaCl. Successivamente vengono aggiunti 20 ml di HCl concentrato. La fase organica è anidrificata con Na₂SO₄ ed evaporata a pressione ridotta. Resa 75.48%, olio incolore ¹H NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ 2.83 (t, 8H, *J*=5.8 Hz), 3.67 (t, 8H), 3.95 (t, 8H, *J*=5.8 Hz); (DMSO-d₆, 125 MHz): δ 17.59, 45.24, 65.67, 68.54, 119.14,

SINTESI DELL'ACIDO 6,6-BIS(4-CARBOSSI-2-OSSABUTIL)-4,8-DIOSSAUNDECANO-1,11-DICARBOSSILICO (8)

Al composto **7** (104 g, 300 mmol.) posto in un pallone a tre colli equipaggiato con termometro e refrigerante, è aggiunto acido cloridrico concentrato (450 ml). La sospensione è lasciata agitare a 70°C per un'ora. Trascorso questo tempo la soluzione è diluita due volte con acqua (450ml) ed è portata a secco a pressione ridotta. L'olio cristallino così ottenuto è solubilizzato in acqua (260 ml) ed estratto con etere dietilico. La fase organica è anidrificata con Na₂SO₄ ed evaporata a pressione ridotta. Ottengo così un solido bianco. ¹H NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ 2.84 (t, 8H, *J*=6. Hz), 3.67 (s, 8H), 3.96 (t, 8H, *J*=6 Hz); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 125 MHz): δ 36.01, 45.43, 67.09, 173.16.

SINTESI DEL TETRAKISFURANO (11)

Al composto **7** (1eq.) solubilizzato in diclorometano anidro viene aggiunto il cloruro di tionile (15eq). La reazione è lasciata a riflusso per tutta la notte. Successivamente, dopo aver evaporato il solvente di reazione, il residuo viene ripreso con THF anidro. Alla miscela così ottenuta, vengono aggiunti alcol furfurilico (6eq) e piridina. Dopo due ore, la soluzione viene filtrata e portata a secco. Il residuo viene ridisciolto in

diclorometano e lavato con acqua. La fase organica è anidrificata con Na₂SO₄ ed evaporata a pressione ridotta. Il composto **11** è purificato tramite cromatografia usando alumina come fase stazionaria e acetato di etile come eluente. Resa 83%, olio di colore bruno: ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): 2.54 (t, 8H), 3.27 (s, 8H), 3.61 (t, 8H), 5.06 (s, 8H), 6.34 (dd, 4H), 6.39 (dd, 4H), 7.40 (q, 4H). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): 34.95, 45.28, 66.60, 69.36, 110.57, 110.64, 143.24, 149.48, 171.34.

SINTESI DEL POLIMERO (12)

Al composto **3** (2 eq) solubilizzato in diclorometano (1 ml) è aggiunto il tetrakis-furano **11** (1 eq). La soluzione è lasciata agitare a 70°C per cinque ore in fiala chiusa al microonde (50watt). Trascorso questo tempo la soluzione è portata a secco a pressione ridotta. Ottengo così un solido cristallino. ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): 2.42-2.50 (m, 9H), 2.94-3.02 (m, 2H), 3.19 (br s, 9H), 3.53 (br s, 10H), 4.34 (d, 1H), 4.57 (d, 1H), 4.59 (s, 5H), 5.27 (m, 1H), 6.25-6.49 (m, 6H), 6.74 (s, 0.5H), 6.88 (d, 1H), 7.05 (d, 3H), 7.13-7.34 (m, 13H), 7.69 (d, 2H).

Bibliografia

- [1] W. H. Wollaston *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* pp 316-330, [Vol.95](#), 1805;
- [2] P. Sabatier and J. B. Senderens, *Compt. Rend.*, **1897**, *124*, 1358;
- [3] H. Kolbe, *J. Prakt. Chem.* [N.F.], **1871**, *4*, 418;
- [4] *Handbook of Organopalladium Chemistry for Organic Synthesis*; Negishi, E., Ed.; Wiley-Interscience: New York, 2002;
- [5] *Palladium Reagents and Catalysts: new perspectives for the 21st century* Tsuji, J.; Wiley & Sons: New York, **2003**;
- [6] Tsuji, J. *Palladium Reagents and Catalysts: Innovations in Organic Synthesis*; Wiley and Sons: New York, **1995**;
- [7] a) *Palladium in Organic Synthesis*; Tsuji, J., Ed.; Springer: Berlin, **2005**. b) Li, J. J.; Gribble, G. W. *Palladium in Heterocyclic Chemistry*; Pergamon: New York, **2000**;
- [8] M. Kitamura, S. Zaman, and K. Narasaka, *Synlett*, 974 (2001);
- [9] E. M. Beccalli, G. Brogini, M. Martinelli, S. Sottocornola, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 5318;
- [10] Richard I. McDonald, Guosheng Liu,[†] and Shannon S. Stahl *Chem. Rev.* 2011, *111*, 2981–3019;
- [11] Keith JA, Henry PM. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2009;48:9038:
- [12] a) Åkermark B, Bäckvall JE, Siirala K, Sjöberg K, Zetterberg K. *Tetrahedron Lett.* 1974;1363. (b) Åkermark B, Zetterberg K. *J. Am. Chem. Soc.* 1984;106:5560;
- [13] C. C. Scarborough, S. S. Stahl, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3251;
- [14] a) T. Antonsson, A. Heumann, C. Moberg, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1986**, 518; b) A. Heumann, C. Moberg, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 1516; c) T. Antonsson, C. Moberg, L. Tottie, A. Heumann, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 4914;
- [15] A. M. Castano, J.-E. Backvall, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 560;
- [16] K. Muñiz, J. Streuff, P. Chávez, C. H. Hövelmann, *Chem. Asian J.* **2008**, *3*, 1248;
- [17] E. J. Alexanian, C. Lee, E. J. Sorensen, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7690;
- [18] F. E. Michael, P. A. Sibbald, B. M. Cochran, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 793;
- [19] C. C. Scarborough, S. S. Stahl, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3251;
- [20] C. H. Hövelmann, J. Streuff, L. Brelot, K. Muñiz, *Chem. Commun.* **2008**, 2334-2336;
- [21] S. D. R. Christie, A. D. Warrington, C. J. Lunniss, *Synthesis* **2009**, 148-154; S. Chandrasekhar, N. K. Reddy, V. P. Kumar, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 3623-3625;
- [22] a) G. Brogini, E. M. Beccalli, E. Borsini, A. Fasana, G. Zecchi *Synlett* **2011**, 227-230 b) A. M. Manzo, A. D. Perboni, G. Brogini, M. Rigamonti, *Synthesis* **2011**, 127-132. c) H. Jiang, S. Ma, G. Zhu, X. Lu, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 10945-10954; b) J. Ji, X. Lu, *Synlett* **1993**, 745-747
-

[23] P. Szolcsányi, T. Gracza, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 8498-8502; b) P. Szolcsányi, T. Gracza, *Chem. Commun.* **2005**, 3948-3950; c) T. Hosokawa, T. Uno, S. Inui, S.-I. Murahashi, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3990-3991;

[24] a) A. H. Jackson, P. Smith, *Chem. Commun.* **1967**, 264-266; b) A. H. Jackson, P. Smith, *Tetrahedron* **1968**, *24*, 403-413; c) A. H. Jackson, P. Smith, *Tetrahedron* **1968**, *24*, 2227-2239; d) A. Ganesan, C. H. Heathcock, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 439-440; e) C. Ferrer, C. H. M. Amijs, A. M. Echavarren, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 1358-137;

[25] M. Garcia, A. Jemal, E.M. Ward, M.M. Center, Y. Hao, R.L. Siegel, M.J. Thun, Global Cancer Facts and Figures, American Cancer Society, Atlanta, 2007.

[26] L. Brunton, J. Lazo, K. Parker, The Pharmacological Basis of Therapeutics, eleventh ed. Goodman and Gilman's, McGraw-Hill, New York, 2005; G. Szakács, J.K. Paterson, J.A. Ludwig, C. Booth-Genthe, M.M. Gottesman, *Nat. Rev. Drug Discov.* **5** (2006) 219-234; N. Zhang, Q. Yang, *Med. Hypotheses* **73** (2009) 1058-1059.

[27] Bali P.K, Zak O. Aisen P. *Biochemistry* **30**, 324-328, 1991; Bridges, K.R. Cudkowicz, *A. J. Biol. Chem.* **259**, 12970-12977, 1984.

[28] Chiotoglou I, Smilevska T, Samara M, Likousi S, Belessi C, Athanasiadou I, Stavroyianni N, Samara S, Laoutaris N, Vamvakopoulos N, Anagnostopoulos A, Fassas A, Stamatopoulos K, Kollia P. *Blood Cells Mol*

[29] O'Donnell KA, Yu D, Zeller KI, Kim JW, Racke F, Thomas-Tikhonenko AT, Dang CV. *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 2373-2386, 2006.

[30] Iritani BM, Eisenman RN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 13180-13185, 1999.

[31] Thomson AM, Rogers JT, Leedman PJ. *J. Biol. Chem.*, **275**, 31609-31615, 2000 Chirasani SR, Markovic DS, Synowitz M, Eichler SA, Wisniewski P, Kaminska B, Otto A, Wanker E, Schäfer M, Chiarugi P, Meier JC, Kettenmann H, Glass R. *J. Mol. Med.*, **87**, 153-167, 2009.

van Staveren WC, Solís DW, Delys L, Duprez L, Andry G, Franc B, Thomas G, Libert F, Dumont JE, Detours V, Maenhaut C. *Cancer Res.*, **67**, 8113-8120, 2007.

Anabousi S, Bakowsky U, Schneider M, Huwer H, Lehr CM, Ehrhardt C. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **29**, 367-374, 2006.

[32] G. Abbiati, E. M. Beccalli, G. Broggin, C. Zoni, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 762; Graves, D. E.; Velea, L. M. *Curr. Org. Chem.* **2000**, *4*, 915-929;

[33] Liu, L. F. *Ann. Rev. Biochem.* **1989**, *58*, 351-375;

[34] Hasing, Y-H.; Liu, L. F.; Wall, M. E.; Wani, M. C.; Nicholas, A. W.; Manikumar, G.; Kirschenbaum, S.; Silber, R.; Potmesil, M. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4385-4389;

[35] LePecq, J. B.; Paoletti, C. *J. Mol. Biol.* **1967**, *27*, 87-106;

-
- [36] Lerman, L. S. *J. Mol. Biol.* **1961**, *3*, 18–30;
- [37] Waring, M. J. *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*, 269–282;
- [38] Gellert, M.; Smith, C. E.; Neville, D.; Felsenfeld, G. *J. Mol. Biol.* **1965**, *11*, 445–457.
- [39] Muller, W.; Crothers, D. M. *J. Mol. Biol.* **1968**, *35*, 251–290.
- [40] LePecq, J. B.; Paoletti, C. *J. Mol. Biol.* **1967**, *27*, 87–106.
- [41] Record, M. T., Jr.; Spolar, R. S., ed. *Nonspecific Protein-DNA Interactions* **1990**, CRC Press, Boca Roca, FL, 33–69.
- [42] a) Cain, B. F.; Atwell, G. J.; Denny, W. A. *J. Med. Chem.* **1975**, *18*, 1110–1117. b) Wilson, W. R.; Baugley, B. C.; Wakelin, L. P. G.; Waring, M. J. *Mol. Pharmacology* **1981**, *20*, 404–414. c) Wadkins, R. M.; Graves, D. E. *Biochemistry* **1991**, *30*, 4277–4283.
- [43] Chaires, C. B. *Biopolymers* **1998**, *44*, 201–215.
- [44] a) Spolar, R. S.; Ha, J. H.; Record, M. T., Jr. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 8382–8385. b) Ha, J. H.; Spolar, R. S.; Record, M. T., Jr. *J. Mol. Biol.* **1989**, *209*, 801–816. c) Sharp, K. A. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 234–239.
- [45] Manning, G. S. *Quart. Rev. Biophys.* **1978**, *11*, 179–246. b) Record, M. T., Jr.; Anderson, C. F.; Lohman, T. M. *Quart. Rev. Biophys.* **1978**, *11*, 103–178.
- [46] a) Record, M. T., Jr.; Lohman, T. M.; DeHaseth, P. *J. Mol. Biol.* **1976**, *107*, 145–158. b) Record, M. T., Jr.; Anderson, C. F.; Lohman, T. M. *Q. Rev. Biophys.* **1978**, *11*, 103–178.
- [47] Friedman, R. A. G.; Manning, G. S. *Biopolymers* **1984**, *23*, 2671–2714.
- [48] Spolar, R. S.; Record, M. T., Jr. *Science* **1994**, *263*, 777–784.
- [49] Dill, K. A. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 701–704. Fox, K. R.; Waring, M. J. *Eur. J. Biochem.* **1984**, *145*, 579–586.
- [50] Crenshaw, J. M.; Graves, D. E.; Denny, W. A. *Biochemistry* **1995**, *34*, 13682–13687
- [51] a) Sobell, H. M. *Scientific American* **1974**, *231*, 82–91. b) Jain, S. C.; Sobell, H. M. *J. Mol. Biol.* **1972**, *68*, 1–20.
- [52] a) White, R. J.; Phillips, D. R. *Biochemistry* **1989**, *28*, 6259–6269. b) Fox, K. R.; Waring, M. J. *Biochemistry* **1986**, *25*, 4349–4356. c) Goodisman, J.; Rehfuss, R.; Ward, B.; Dabrowiak, J. C. *Biochemistry* **1992**, *31*, 1046–1058. d) Marsch, G. A.; Graves, D. E.; Rill, R. L. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 1252–1259.
- [53] a) Crooke, S. T.; Reich, S. D., Eds. *Anthracyclines* **1980**, Academic Press, New York. b) Arcamone, F., Cassinelli, G., Penco, S. in *The Anthracyclines*; ed. H. S. El Khadem, **1982**, Academic Press, New York, pp 59–74.
- [54] Crenshaw, J. M.; Graves, D. E.; Denny, W. A. *Biochemistry* **1995**, *34*, 13682–13687
- [55] Hyperchem, Release 7.5, Hypercube Inc., Gainesville, FL, USA.
- [56] W.D. Cornell, P. Cieplak, C.I. Bayly, I.R. Gould, K.M. Merz Jr., D.M. Ferguson, D.C. Spellmeyer, T. Fox, J.W. Caldwell, P.A. Kollman, A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules, *J. Am. Chem. Soc.* **117** (1995) 5179e5197.
- [57] O.A. Santos-Filho, J.D. Figueroa-Villar, M.T. Araujo, Molecular modeling of
-

the interaction of trypanocide guanyl hydrazones with B-DNA, *Biorg. Med. Chem. Lett.* 7 (1997) 1797e1802.

[58] G.M. Morris, D.S. Goodsell, R.S. Halliday, R. Huey, W.E. Hart, R.K. Belew, A.J. Olson, Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function, *J. Comput. Chem.* 19 (1998) 1639e1662.

[59] (a) P.A. Holt, J.B. Chaires, O. Trent, Molecular docking of intercalators and groove-binders to nucleic acids using autodock and surflex, *J. Chem. Inf. Model.* 48 (2008) 1602e1615;

(b) C. Detering, G. Varani, Validation of automated docking programs for docking and database screening against RNA drug targets, *J. Med. Chem.* 47 (2004) 4188e4201.

[60] M.F. Sanner, Python: a programming language for software integration and development, *J. Mol. Graphics Mod.* 17 (1999) 57e61.

[61]. **Syrett, Jay A., Remzi Becer, C. and Haddleton, David M.** Self-Healing and Self-Mendable Polymers. *The Royal Society of Chemistry*. 2010, 1.

[62] Wilson DJK, Wells JN, Hay D, Owens GA, Johnson F. Preliminary investigation into microcracking of PMR-15 graphite composites—Part I, effect of cure temperature. In: 18th international SAMPE technical conference, Washington, USA, vol. 18, 1986, p. 242–253

[63]. **Kalista, Stephen J.** Self-Healing of Thermoplastic Poly(Ethylene-co-Methacrylic Acid) Copolymers Following Projectile Puncture. *Thesis - Master of Science in Engineering Mechanics*. Blacksburg, VA : Virginia Polytechnic Institute, 2003.

[64]. Carlson HC, Goretta KC. Basic materials research programs at the US air force office of scientific research. *Mater Sci Eng Part B—Solid State Mater Adv Tech* 2006

[65]. Semprimosching C European Apace Agency Materials Report Number 4476. Enabling self-healing capabilities a small step to bio-mimetic materials. Noordwijk: European Space Agency; 2006.

[66]. Wool RP, O'Connor KM. A theory of crack healing in polymers. *J Appl Phys* 1981;52:5953–63.

[67]. Espuche E, Galy J, Gerard JF, Pascault JP, Sautereau H. Influence of cross-link density and chain flexibility on mechanical-properties of model epoxy networks. *Macromol Symp* 1995;93:107–15.

[68]. Pham HQ, Marks MJ. Epoxy resins. In: Kirk RE, Othmer DF, Kroschwitz JI, Howe-Grant M, editors. *Encyclopaedia of chemical technology*. New York: Wiley; 1991

[69]. Kim NH, Kim HS. Micro-void toughening of thermosets and its mechanism. *J Appl Polym Sci* 2005;98:1290–5.

[70]. Unnikrishnan KP, Thachil ET. Toughening of epoxy resins. *Des Monomers Polym* 2006;9:129–52

[71] Dry CM, Sottos NR. Passive smart self-repair in polymer matrix composite materials. In: *Conference on recent advances in adaptive and sensory materials and their applications*. Virginia, USA: Technomic; 1992. p. 438–44.

[72]. White SR, Sottos NR, Geubelle PH, Moore JS, Kessler MR, Sriram SR, et

-
- al. Autonomic healing of polymer composites. *Nature* 2001;409:794–7.
- [73]. Harreld JH, Wong MS, Hansma PK, Morse DE, Stucky GD. Self-healing organosiloxane materials containing reversible and energy-dispersive crosslinking domains US: University of California U; 2004. [2004007792-A1].
- [74]. **Ward, I. M. and Sweeney, J.** *An Introduction to Mechanical Properties of Solid Polymers*. Chichester, West Sussex, England : John Wiley & Sons Ltd., 2004. ISBN 978-0471496267.
- [75]. Dry CM. Procedures developed for self-repair of polymer matrix composite materials. *Compos Struct* 1996;35:263–9.
- [76]. Bleay SM, Loader CB, Hawyres VJ, Humberstone L, Curtis PT. A smart repair system for polymer matrix composites. *Compos Part A—Appl Sci Manuf* 2001;32:1767–76.
- [77]. *Self-Repairing Systems based on Ionomers and Epoxidized Natural Rubber Blends*. **Rahman, Arifur M., et al.** 12, s.l. : ACS Applied Materials & Interfaces, 2011,
- [78] Wool, Richard P. *Polymer Interfaces: Structure and Strength*. New York : Hanser Gardner Pubns , 1995.
- [79]. *Self healing of blends based on sodium salt of poly(ethylene-co-methacrylic acid) / poly(ethylene-co-vinyl alcohol) and epoxidized natural rubber following high energy impact*. **Grande, Antonio M., et al.** Bath, UK : 3rd International Conference on Self-Healing Materials, 2011.
- [80] White SR, Sottos NR, Geubelle PH, Moore JS, Sriram SR, Kessler MR, et al. Multifunctional autonomically healing composite material (Evan Law Group U) US:2006111469-A1, 2006.
- [81]. Wybrow RJ, Stevenson NG, Harrity JPA. Investigation of diastereoselective tandem ring closing metathesis reactions towards the synthesis of functionalised spirocyclic piper piperidines. *Synlett* 2004;1:140–2.
- [82]. Mol JC. Industrial applications of olefin metathesis. *J Mol Catal A: Chem* 2004;213:39–45 [83]. Craven, J. M., US patent 3.435.003 (1969).
- [84]. Bergman, S.D. and Wudl, F. (2008) Mendable polymers. *Journal of Materials Chemistry*, **18(1)**, 41-62.
- [85]. Wool, R.P. (2008) Self-healing materials: A review. *Soft Matter*, **4(3)**, 400-418.
- [86]. Grubbs RH, Sanford M. Mechanism of ruthenium based olefin metathesis catalysts. In: Khosravi E, Szymanska-Buzar T, editors. *Ring opening metathesis polymerization and related chemistry: state of the art and vision for the new century*. Boston: Kluwer Academic Publishers; 2002.p. 17–22.
- [87]. Sriram SR. Development of self-healing polymer composites and photoinduced ring opening metathesis polymerisation. Doctor of Philosophy thesis, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, USA, 2002.
- [88]. Kessler MR, White SR. Self-activated healing of delamination damage in woven composites. *Compos Part A—Appl Sci Manuf* 2001;32:683–99.
- [89]. Kessler MR, White SR. Cure kinetics of the ring-opening metathesis polymerization of dicyclopentadiene. *J Polym Sci Part A—Polym Chem* 2002;40:2373–83.
-

-
- [90]. Chen X, Wudl F, Mal AK, Shen H, Nutt SR. New thermally remendable highly cross-linked polymeric materials. *Macromolecules* 2003;36:1802–7.
- [91]. Chen XX, Dam MA, Ono K, Mal A, Shen HB, Nutt SR, et al. A thermally re-mendable cross-linked polymeric material. *Science* 2002;295:1698–702.
- [92]. Rule JD, Moore JS. ROMP reactivity of endo- and exodicyclopentadiene. *Macromolecules* 2002;35:7878–82.
- [93]. Diels, O. and Alder, K. (1928). Synthesen in der hydroaromatischen Reihe. *Liebigs Annalen der Chemie*, **460(1)**, 98-122.
- [94]. Wudl F, Chen X. Thermally re-mendable cross-linked polymers. University of California U, US:2004014933-A1, 2004.
- [95]. G.A. Pagani, A. Abbotto "Chimica Eterociclica" Piccin.
- [96]. Norman & Coxon "Principi Di Sintesi Organica" Piccin.
-